



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Pediatría

TESIS DOCTORAL

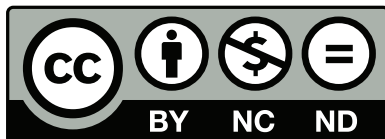
**PAPEL DEL TEST DE ACTIVACIÓN DE  
BASÓFILOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA  
RINITIS ALÉRGICA LOCAL**

Esther Barrionuevo Sánchez

Málaga, 2014

AUTOR: Esther Barrionuevo Sánchez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer  
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de  
Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Don MIGUEL BLANCA GÓMEZ, Doctor en Medicina y Cirugía y Doña PALOMA CAMPO MOZO, Doctora en Medicina y Cirugía,

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta ESTHER BARRIONUEVO SÁNCHEZ con el título **“Papel del test de activación de basófilos en el diagnóstico de la rinitis alérgica local”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Málaga a 23 de Abril de 2014.

Fdo. Miguel Blanca Gómez

Fdo. Paloma Campo Mozo





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Doña ELISA MARTÍN MONTAÑEZ, Doctora en Farmacia, Profesora Contratada,  
Doctora del Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta ESTHER BARRIONUEVO SÁNCHEZ, con el título  
**“Papel del test de activación de basófilos en el diagnóstico de la rinitis alérgica local”** se ha realizado bajo mi tutela y considero que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 23 de Abril de 2014.

Fdo. Dra. Elisa Martín Montañez





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Yo, ESTHER BARRIONUEVO SÁNCHEZ, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación cuyo título es **“Papel del test de activación de basófilos en el diagnóstico de la rinitis alérgica local”**, que ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Miguel Blanca Gómez y la Dra. Paloma Campo Mozo y bajo la tutela de la Dra. Elisa Martín Montañez.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Málaga a 23 de Abril de 2014.

Fdo. Esther Barrionuevo Sánchez





## *AGRADECIMIENTOS*



Sería atrevido por mi parte afirmar que el desarrollo de esta Tesis Doctoral entraba en mis planes cuando estudiaba la carrera de Medicina. Sin embargo, después de acabar la carrera y hacer el temido examen MIR aterrizo casi sin ser demasiado consciente en el Servicio de Alergología del Hospital Carlos Haya de Málaga, hoy casi mi segunda casa... Día a día se me van olvidando las clases de la facultad, hoy también añoradas, y comienzo a enfrentarme cara a cara con el paciente y la enfermedad. Es entonces verdaderamente cuando empiezo a ser consciente de lo que es ser médico. Pero al mismo tiempo comienzo a plantearme interrogantes, algunos con respuestas y otros con ganas de responder.... Empiezo entonces a comprender lo importante que es la clínica y la investigación, y que es prácticamente imposible entender la una sin la otra. Comienzo a darme cuenta de que la Medicina en general, y la Alergia en particular, no se entiende ni avanza sin la búsqueda de la causa, sin la investigación. Tengo así que daros las gracias Miguel, Pepa, Paloma y Lina, porque desde el primer momento me habéis transmitido las ganas por trabajar con esfuerzo para intentar dar respuesta a muchos de esos interrogantes. Gracias por hacerme partícipe de este trabajo y en particular a Paloma por ayudarme en todo momento para lograrlo. Gracias a todos los compañeros de Laboratorio (Ana, Lidia, Pepe, Adri, Tahía, Cornejo, Raquel,...) por enseñarme vuestro trabajo y estar ahí cuando necesito de vosotros. Tengo también que daros las gracias a vosotras, Paqui, María, Inma y Gábor, porque si bien la Residencia es una andadura como poco intensa, gracias a vosotras se me ha hecho más llevadera, gracias por ayudarme y apoyarme con este trabajo y espero y deseo que, como se suele decir, solo sea el principio de lo que ya considero una bonita amistad. Y sin duda tengo que dar las gracias a "mi gente", a mis padres, mis hermanas Raquel y Yolanda, a Fede, mis amigos y mis niñas (Berta, Anita y Dulce), porque vosotros mejor que nadie sabéis lo que para mi supone este trabajo, porque me entendéis, me apoyáis, me dáis buenas razones para seguir esforzándome, porque me aguantáis y porque en definitiva queréis verme feliz, A TODOS GRACIAS!!



*A MIS PADRES*





## ÍNDICE



<b>1. REACCIONES ALÉRGICAS A ALÉRGENOS</b>	<b>5</b>
1.1 Reacciones Tipo I o de hipersensibilidad inmediata	5
1.2 Reacciones Tipo II, por anticuerpos citolíticos o citotóxicos	6
1.3 Reacciones Tipo III inducida por inmunocomplejos	6
1.4 Reacciones Tipo IV o de hipersensibilidad retardada	6
<b>2. DEFINICIÓN DE RINITIS</b>	<b>8</b>
<b>3. ASPECTOS ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS GENERALES DE LAS FOSAS NASALES</b>	<b>8</b>
3.1. Anatomía macroscópica de las fosas nasales	8
3.2. Ultraestructura de las fosas nasales	9
3.3 Tipos celulares de la mucosa nasal	10
3.4. Vascularización de las fosas nasales	14
3.5. Inervación de las fosas nasales	15
3.6. Fisiología de las fosas nasales	15
<b>4. CLASIFICACIÓN DE LA RINITIS</b>	<b>16</b>
4.1. Aspectos generales: clasificación de la rinitis alérgica y no alérgica	16
4.2. Clasificación de la rinitis alérgica (RA)	17
4.3. Clasificación de la rinitis no alérgica (RNA)	21
4.3.1. Clasificación de la RNA con factor desencadenante conocido:	21
4.3.2. Clasificación de la RNA con factor desencadenante desconocido:	24
4.4. Importancia de la rinitis alérgica local (RAL) en la clasificación de la RA:	26
<b>5. RINITIS ALÉRGICA SISTÉMICA Y LOCAL</b>	<b>28</b>
5.1 Epidemiología de la rinitis alérgica sistémica y local	28
5.2 Factores de riesgo de la rinitis alérgica sistémica y local	33

5.3 Etiopatogenia y fisiopatología de la rinitis alérgica sistémica y local-----	39
5.3.1 Reacción alérgica IgE mediada en la rinitis alérgica _____	39
5.3.2. Fases de la respuesta alérgica nasal en la rinitis alérgica _____	40
5.3.3 Etiopatogenia y fisiopatología de la RAL _____	47
5.3.4. Alérgenos _____	52
5.4. Diagnóstico de la rinitis alérgica sistémica y local _____	56
5.5. Tratamiento de la rinitis alérgica sistémica y local _____	76
<b>6. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS (TAB) _____</b>	<b>82</b>
6.1 El basófilo en la reacción alérgica IgE mediada _____	82
6.2 Activación de basófilos _____	85
6.3 Inhibición del TAB con <i>Wortmanina (WTM)</i> _____	88
6.4 Uso del TAB en el diagnóstico de la patología alérgica _____	89
6.4.1 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a alérgenos _____	89
6.4.2 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a medicamentos _____	92
6.4.3 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a veneno de himenópteros ____	93
<b>JUSTIFICACIÓN _____</b>	<b>95</b>
<b>OBJETIVOS _____</b>	<b>101</b>
<b>ARTÍCULOS _____</b>	<b>105</b>
ARTÍCULO 1 _____	109
ARTICULO 2 _____	119
ARTÍCULO 3 _____	143
<b>DISCUSIÓN _____</b>	<b>173</b>
<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>195</b>

# INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

<b>Figura1:</b> Tipos de reacciones de hipersensibilidad según la clasificación de Gell y Coombs	5
<b>Figura 2:</b> Pared lateral de las fosas nasales.	6
<b>Figura 3:</b> Capas de la mucosa respiratoria nasal	7
<b>Figura 4:</b> Basófilo circulante en sangre periférica.	9
<b>Figura 5:</b> Clasificación etiológica de la rinitis	15
<b>Figura 6:</b> Nueva clasificación etiológica de la rinitis	25
<b>Figura 7:</b> Secuencias de acontecimientos de las reacciones alérgicas inmediatas: fase de sensibilización y desarrollo de la respuesta alérgica inmediata	37
<b>Figura 8:</b> Fase precoz de la respuesta alérgica nasal	40
<b>Figura 9:</b> Fase tardía de la respuesta alérgica nasal	42
<b>Figura 10:</b> Principales alérgenos implicados en la rinitis alérgica	51
<b>Figura 11:</b> Dermatophagoides pteronyssinus	51
<b>Figura 12:</b> Polen de olivo (Imagen de M.E.)	54
<b>Figura 13:</b> Ole e1. Tomado de Villalba M, 1993.	54
<b>Figura 14:</b> Algoritmo diagnóstico de la rinitis alérgica.	56
<b>Figura 15:</b> Exploración nasal mediante rinoscopia anterior utilizando un espéculo de Killian y fuente de luz	57
<b>Figura 16:</b> Exploración nasal mediante endoscopio nasal rígido	57
<b>Figura 17:</b> Endoscopia nasal en un paciente con rinitis alérgica	57
<b>Figura 18:</b> Exploración endoscópica nasal mediante endoscopio flexible	57
<b>Figura 19:</b> Prueba cutánea intraepidérmica o prick test	59
<b>Figura 20:</b> Algoritmo diagnóstico de la RAL, adaptado por Rondón y col., 2010.	61
<b>Figura 21:</b> Aplicación nasal de extracto con micropipeta en cabeza de cornete	

inferior_____	64
<b>Figura 22:</b> Métodos objetivos para valorar la obstrucción nasal_____	66
<b>Figura 23:</b> Mascarilla facial para la realización de rinomanometría anterior activa ____	67
<b>Figura 24:</b> Registro de flujos y presiones sobre un eje de coordenadas, en el que se representa el flujo en ordenadas, la presión en abscisas, la fosa nasal derecha en cuadrante I y III y la fosa nasal izquierda en cuadrantes II y IV_____	68
<b>Figura 25:</b> Registros de exploración de permeabilidad nasal mediante rinomanometría anterior activa en sujeto sin patología nasal (a la izquierda) y con rinitis alérgica (a la derecha) _____	69
<b>Figura 26:</b> Equipo de rinometría acústica_____	70
<b>Figura 27:</b> Desarrollo de la exploración nasal mediante rinometría acústica _____	70
<b>Figura 28:</b> Registro de rinometría acústica en sujeto sin patología nasal. El registro de resultados va antero-posterior desde la narina hasta el cavum. Registro interior: situación basal, registro exterior: post- vasoconstrictor nasal ____	70
<b>Figura 29:</b> Rinometría acústica en un sujeto con rinitis e hipertrofia de cornetes ____	71
<b>Figura 30:</b> Valoración del test de provocación nasal con alérgeno mediante rinometría acústica. Las líneas azules representan la gráfica de referencia realizada tras la instilación de suero fisiológico, y las líneas rojas la gráfica tras la instilación del alérgeno _____	71
<b>Figura 31:</b> Medidor del flujo máximo nasal inspiratorio, módulo de registro y mascarilla nasobucal. _____	72
<b>Figura 32:</b> Maniobra de inspiración nasal para la medición del flujo máximo nasal inspiratorio_____	72
<b>Figura 33:</b> Tratamiento farmacológico de la rinitis alérgica _____	77
<b>Figura 34:</b> Reacción de hipersensibilidad inmediata Tipo I. _____	81
<b>Figura 35:</b> Basófilos activados circulantes en sangre periférica. _____	82
<b>Figura 36:</b> Test de activación de basófilos (TAB) _____	84

<b>Figura 37:</b> Citómetro de flujo FACSCalibur. _____	85
<b>Figura 38:</b> TAB positivo a DP en un paciente con RAS por ácaros del polvo. _____	85
<b>Figura 39:</b> Papel de la Wortmanina en la inhibición de la activación específica del basófilo mediada por IgE _____	86

## TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de la rinitis alérgica. Tomado de Bousquet J, 2008. _____	17
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de la rinitis alérgica propuesta por Valero y col., 2007 _____	17
<b>Tabla 3:</b> Clasificación etiológica de la rinitis, adaptada por Rondón y col.,2012. _____	26
<b>Tabla 4:</b> Datos demográficos y clínicos en pacientes con RAL y RNA _____	36
<b>Tabla 5:</b> Tratamiento sintomático de rescate empleado en RAL. _____	79

## ABREVIATURAS

**AAAAI:** Academia americana de alérgica, asma e inmunología, *del inglés The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*

**AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos

**ARIA:** del inglés, *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*

**ARNm:** Ácido rinonucleico mensajero

**ATM:** Área transversa mínima

**BLs:** Betalactámicos

**BP:** Bencilpenicilina o Penicilina G

**CCR3:** Receptor de quimiocina tipo3, del inglés *C-C chemokine receptor type 3*

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina, del inglés *calcitonin gene-related peptide*

**COX:** Ciclooxygenasa

**CPA:** Célula presentadora de antígenos

**DP:** *Dermatophagoides pteronyssinus*

**EAACI:** Academia europea de alérgica e inmunología clínica, *del inglés The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

**ECP:** Proteína catiónica del eosinófilo, del inglés *eosinophil cationic protein*

**ECRHS:** Encuesta de Salud de la Comunidad Europea de Enfermedades Respiratorias, del inglés *European Community Respiratory Health Survey*

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción acoplado a actividad enzimática, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*.

**END:** Neurotoxina derivada del eosinófilo, del inglés *Eosinophil-Derived Neurotoxin*

**EPO:** Peroxidasa del eosinófilo, del inglés *eosinophil peroxidase*

**EVA:** Escala visual analógica

**FcεRI:** receptor de alta afinidad de IgE

**fMLP:** N-formil-metionina-leucina-fenilalanina

**GM-CSF:** Factor estimulador de crecimiento de colonias de monocitos y granulocitos, del inglés *growth-stimulating factor and granulocyte-monocyte colony*

**HLA:** Antígeno leucocitario humano, del inglés *human leukocyte antigen*

**ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular 1, del inglés [Intercellular Adhesion Molecule 1](#)

**IE:** Índice de estimulación

**IECAs:** Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

**IFN-γ:** Interferón γ

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IL:** Interleuquina

**IL<sub>1</sub>:** Interleuquina 1

**IL-1β:** Interleuquina 1β

**IL-1rα:** Interleuquina 1rα

**IL-1RII:** Receptor de IL1 tipo II

**IL<sub>2</sub>:** Interleuquina 2

**IL<sub>3</sub>:** Interleuquina 3

**IL<sub>4</sub>:** Interleuquina 4

**IL<sub>5</sub>:** Interleuquina 5

**IL<sub>6</sub>:** Interleuquina 6

**IL<sub>8</sub>:** Interleuquina 8

**IL<sub>10</sub>:** Interleuquina 10

**IL<sub>12</sub>:** Interleuquina 12

**IL<sub>13</sub>:** Interleuquina 13

**ISAAC:** Estudio internacional sobre asma y alergias en la infancia, del inglés *International Study on Asthma and Allergies in Childhood*

**LT:** Leucotrieno

**LT B<sub>4</sub>:** Leucotrieno B<sub>4</sub>

**LT C<sub>4</sub>:** Leucotrieno C<sub>4</sub>

**LT D<sub>4</sub>:** Leucotrieno D<sub>4</sub>

**LT E<sub>4</sub>:** Leucotrieno E<sub>4</sub>

**LT-cis:** Leucotrieno cisteinílico

**LTh:** Linfocito T cooperador, del inglés *T helper cells*

**LTh<sub>0</sub>:** Linfocito T colaborador virgen

**LTh<sub>1</sub>:** Linfocito T colaborador tipo 1

**LTh<sub>2</sub>:** Linfocito T colaborador tipo 2

**MBP:** Proteína básica del eosinófilo, del inglés *major basic protein*

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos, del inglés *Monocyte chemotactic protein-1*

**MCR:** Medios de contraste radiológico

**NARES:** Síndrome de rinitis no alérgica con eosinofilia

**NKA:** Neuroquinina A

**OMS:** Organización mundial de la salud

**ONn:** Óxido nítrico nasal



**PAF:** Factor activador plaquetario, del inglés *platelet activating factor*

**PG:** Prostaglandina

**PG D<sub>2</sub>:** Prostaglandina D2

**PG E<sub>1</sub>:** Prostaglandina E1

**PG E<sub>2</sub>:** Prostaglandina E2

**PG F<sub>2</sub>:** Prostaglandina F2

**PG I<sub>2</sub>:** Prostaglandina I2

**PNY:** Neuropeptido Y

**PHI:** Péptido histidina isoleucina

**RA:** Rinitis alérgica

**RAL:** Rinitis alérgica local

**RANTES:** regulador de la expresión y secreción de células T, del inglés *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*

**RAS:** Rinitis alérgica sistémica

**RAST:** Prueba radioalergoabsorbente, del inglés *Radioallergosorbent Test*

**RI:** Rinitis idiopática

**RNA:** Rinitis no alérgica

**SCARPOL:** Estudio suizo de las alergias y síntomas respiratorios en la infancia con respecto a la contaminación del aire, del inglés *Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution*

**SCF:** Factor de las células madre, del inglés *Stem Cell Factor*

**SEAIC:** Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica

**SNC:** Sistema nervioso central

**SP:** Sustancia P

**TAB:** Test de activación de basófilos

**TGF- $\beta$ :** Factor transformador del crecimiento  $\beta$ , del inglés *transforming growth factor  $\beta$*

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TPN:** Test de provocación nasal

**TPN-M:** Test de provocación nasal con múltiples alérgenos

**TxA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>

**Tx B<sub>2</sub>:** Tromboxano B<sub>2</sub>

**VAM-1:** Molécula de adhesión vascular 1, del inglés *vascular adhesión molecule1*

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo, del inglés *vasoactive intestinal peptide*

**WTM:** Wortmanina



# INTRODUCCIÓN



## 1. REACCIONES ALÉRGICAS A ALÉRGENOS

El sistema inmunológico está involucrado en la defensa del organismo frente a sustancias extrañas y en la realización de mecanismos efectores para atacar y destruir estos cuerpos extraños. Estos procesos producen efectos beneficiosos frente a agentes infecciosos, pero hay casos en los que se originan respuestas alteradas que producen daños en los tejidos mediante la formación de anticuerpos específicos, linfocitos sensibilizados o ambos (de Weck AI, 1983) frente a unas sustancias que en otros individuos no inducen ningún tipo de reacción. A esto es lo que se denomina reacción de hipersensibilidad (Corominas, 1991). Esta lesión tisular puede producirse, principalmente, en situaciones que difieren en el origen del antígeno, en el mecanismo implicado así como en las manifestaciones que inducen. Teniendo en cuenta estas diferencias, Gell y Coombs establecieron una clasificación de las reacciones alérgicas en cuatro tipos, utilizando como criterios el mecanismo efector que la desencadena (Gell P, 1963) (Figura 1).

### 1.1 Reacciones Tipo I o de hipersensibilidad inmediata

Se caracterizan por la aparición de los efectos inmediatamente después del contacto del individuo con el antígeno responsable, dentro de la primera hora. Se producen por la interacción de un antígeno (Ag) con un anticuerpo (Ac) IgE específico que se encuentra unido mediante receptores Fc a la superficie de mastocitos y basófilos. En la fase de sensibilización el Ag es captado por las células presentadoras de antígenos (CPA) y presentado a los linfocitos T. Estos posteriormente interaccionan con las células B y a través de moléculas de coestimulación y de la producción de IL-4 se induce su proliferación y los cambios necesarios para la producción de moléculas de IgE específicas. Éstas son secretadas al torrente sanguíneo y se fijan a través de su región Fc a los receptores de alta afinidad (FcεRI) existentes en la superficie de los basófilos circulantes y de los mastocitos tisulares. Cuando en una segunda entrada del Ag, éste se une a dos o más moléculas de IgE adyacentes de forma simultánea, se produce el fenómeno denominado “puenteo” (de Weck, 1983) que desencadena una

cascada enzimática que en último término provoca la activación y degranulación de estas células y la liberación de mediadores inflamatorios como histamina, leucotrienos y triptasa, que son los responsables de las manifestaciones clínicas.

### **1.2 Reacciones Tipo II, por anticuerpos citolíticos o citotóxicos**

Este tipo de hipersensibilidad ocasiona la destrucción de las células infectadas mediante lisis o por mediadores tóxicos. En estas reacciones los Ag pueden unirse a la membrana plasmática de eritrocitos, neutrófilos, plaquetas y células epiteliales de glándulas y mucosas. Posteriormente, los anticuerpos circulantes, fundamentalmente IgG e IgM y, en menor medida, IgA cubren las células y éstas activarán la vía clásica del complemento o se unirán a los receptores Fc de fagocitos y células NK. Las manifestaciones clínicas más habituales son la anemia hemolítica inmune, la trombopenia, o la granulocitopenia.

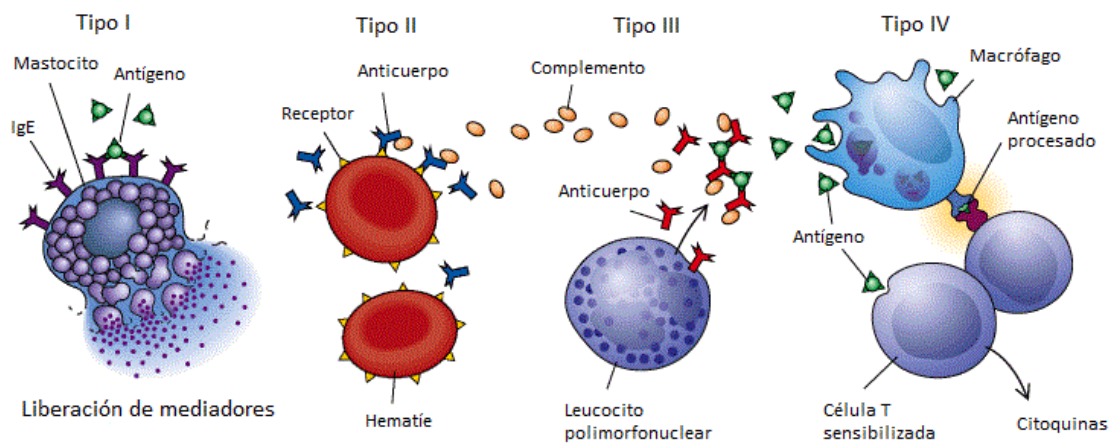
### **1.3 Reacciones Tipo III inducida por inmunocomplejos**

La interacción de Ags con sus Ac circulantes correspondientes produce la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Normalmente estos complejos son retirados de forma eficaz por los monocitos del sistema mononuclear fagocítico pero en presencia de cantidades excesivas de antígenos solubles la retirada de estos inmunocomplejos puede ser ineficaz y su acumulación puede llevar a una reacción de hipersensibilidad, ya que éstos se depositan en el endotelio de vasos sanguíneos, causando un daño secundario a las células. Los inmunocomplejos depositados en los tejidos afectados pueden activar el complemento o interaccionar directamente con basófilos y plaquetas. Los síntomas clínicos dependen del órgano diana en el que se depositan, fundamentalmente, riñones, pulmones, articulaciones y piel.

### **1.4 Reacciones Tipo IV o de hipersensibilidad retardada**

Este tipo de reacciones suelen producirse a partir de las 24 horas tras la exposición al Ag y también son denominadas de hipersensibilidad tardía. No son mediadas por Ac, sino que el antígeno es captado por CPAs y presentado a las células T que actúan como células efectoras.

El contacto entre el Ag y las células T hace que la célula prolifere y libere quimioquinas que atraen linfocitos T de memoria específicos, a los que ya se les había presentado el antígeno en el proceso de sensibilización. Una vez en el tejido, estas células liberan mediadores proinflamatorios y otras citoquinas específicas que atraen hacia el tejido a monocitos, macrófagos y otras células T que son las encargadas de dar lugar a la respuesta inflamatoria.



**Figura 1 Tipos de reacciones de hipersensibilidad según la clasificación de Gell y Coombs.**

Dentro de las reacciones de hipersensibilidad, las más frecuentes son las que están mediadas por IgE (Tipo I), o por células T (Tipo IV). Las manifestaciones clínicas de las reacciones tipo I se deben a la acción de los mediadores que producen vasodilatación con aumento de la permeabilidad, contracción del músculo liso, agregación de plaquetas, infiltrado inflamatorio, aumento de la secreción de moco y estímulo de los nervios sensitivos. Los signos y síntomas van a depender del órgano diana, pudiendo localizarse en piel (urticaria), vías respiratorias (rinitis, asma bronquial), tubo digestivo (vómitos, dolor abdominal y diarrea), o bien ser generalizada, como en el shock anafiláctico (prurito, urticaria, hipotensión, angioedema, y broncoespasmo), pudiendo causar incluso la muerte. De todas ellas la rinitis alérgica es, sin duda, el proceso alérgico respiratorio más frecuente.



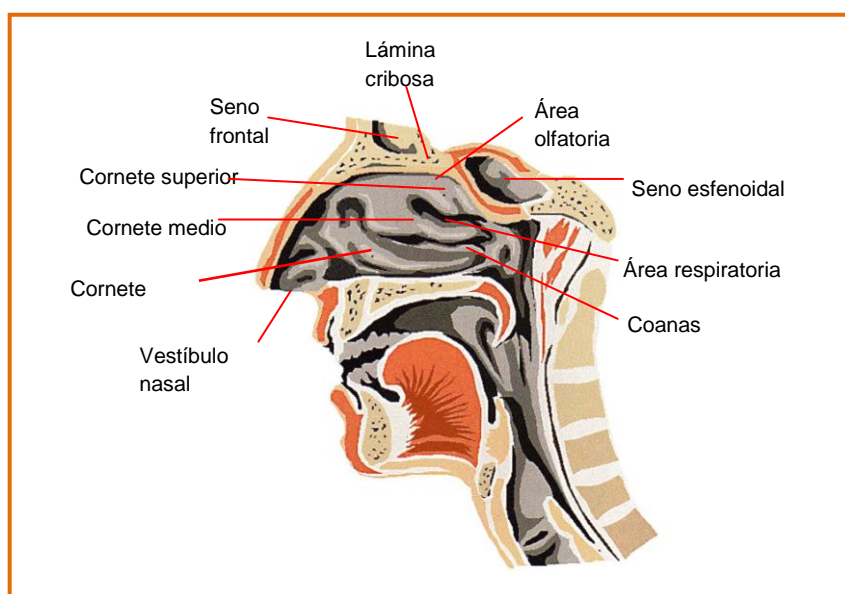
## 2. DEFINICIÓN DE RINITIS

La rinitis se define como una inflamación de la mucosa nasal que se caracteriza por síntomas nasales incluidos la rinorrea anterior o posterior, estornudos, bloqueo y/o prurito nasal (Bousquet J, 2008). Estos síntomas ocurren durante dos o más días consecutivos durante más de una hora la mayoría de los días (*International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994*).

## 3. ASPECTOS ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS GENERALES DE LAS FOSAS NASALES

### 3.1. Anatomía macroscópica de las fosas nasales

Las fosas nasales, junto con los senos paranasales, constituyen un órgano multifuncional. Entre las distintas funciones se encuentran la respiratoria, la sensorial (olfacción), la fonatoria y la adaptación del organismo al medio ambiente. El exterior de la nariz tiene forma de pirámide y está formado por estructuras óseas, cartilaginosas y musculocutáneas. La estructura interna de la nariz o fosas nasales son dos corredores de 7'5 cm de largo y 5 cm de alto, separados por el tabique nasal, que canalizan y acondicionan el aire inspirado.



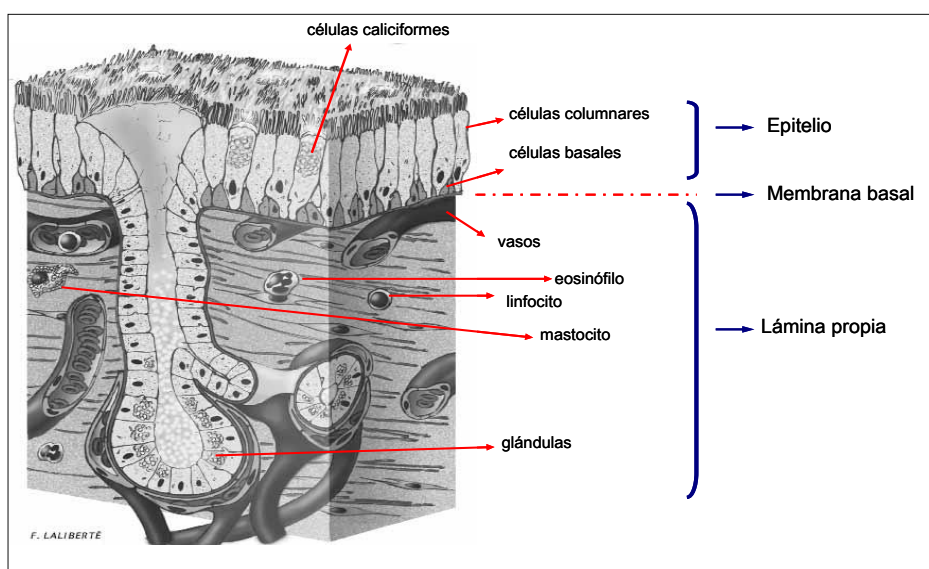
**Figura 2.** Pared lateral de las fosas nasales. Tomado de Mérida Fernández C, 2004.

Las fosas nasales presentan orificios anteriores o narinas, orificios posteriores o coanas, pared superior o techo, pared inferior o suelo, pared interna, medial o tabique y la pared lateral, externa o naso-orbito-sinusal. Esta última consta de unos repliegues óseos denominados cornetes (tres constantes y uno variable). El cornete inferior es el de mayor tamaño y es un hueso independiente de 3-4cm. Está recubierto por mucosa que contiene grandes espacios vasculares, los cuales constituyen un tejido eréctil que pueden hincharse y obstruir la nariz, motivo por lo que el cornete inferior es la estructura de la fosa nasal que mejor va a traducir una respuesta inflamatoria tras el contacto con el alérgeno y que podremos objetivar mediante el test de provocación nasal con alérgenos (TPNA).

Además, cada fosa nasal puede dividirse en cuatro partes: vestíbulo, atrio (que desde el extremo superior del cornete medio se dirige hacia el vestíbulo), la región olfatoria y la región respiratoria, que constituye el resto de la cavidad (Mérida Fernández C, 2004) (Figura2).

### 3.2. Ultraestructura de las fosas nasales

Las fosas nasales están tapizadas por una mucosa que, desde el punto de vista microscópico, podemos diferenciar en dos tipos: respiratoria y olfatoria. Ambas constan de epitelio y lámina propia, separadas por la membrana basal (Mérida Fernández C, 2004) (Figura3).



**Figura 3.** Capas de la mucosa respiratoria nasal. Tomado de Bousquet J, 2001.

La mucosa olfatoria (2-3 cm<sup>2</sup>) tapiza el techo de las fosas nasales y se extiende mínimamente hacia abajo por la pared lateral y el *septum*. Por su aspecto se denomina “mancha amarilla” y en ella se encuentra el órgano de la olfacción. La mucosa respiratoria recubre prácticamente la totalidad de las fosas, diferenciándose una zona vestibular en el tercio anterior y la zona respiratoria en los dos tercios posteriores de la cavidad nasal. El epitelio en la zona respiratoria es cilíndrico pseudoestratificado, con células firmemente unidas que conforman una barrera física frente al flujo paracelular y a agentes nocivos (Baroody FM, 1994).

### 3.3 Tipos celulares de la mucosa nasal

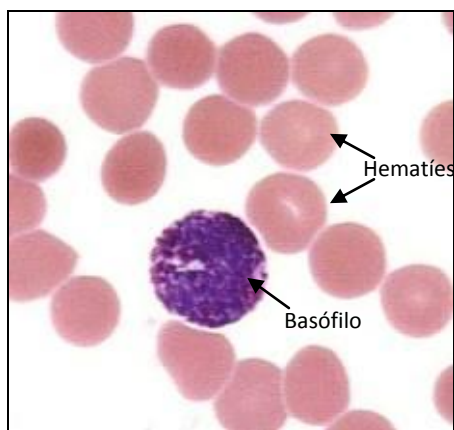
**-Mastocitos:** son un grupo heterogéneo de células que participan en las reacciones alérgicas, la infestación parasitaria, la inflamación, la reestructuración tisular y la angiogénesis (Church MK, 2003). Son células de origen hematopoyético (CD34+), que emigran a los tejidos como precursores inmaduros, donde se diferencian bajo la influencia de factores microambientales, adquiriendo sus gránulos característicos y el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI) (Church MK, 2003; Pawankar R, 1997; Salib RJ, 2005). En sus gránulos se almacenan mediadores preformados: aminas (histamina), proteasas (triptasa y quimasa), citoquinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) y proteoglicanos (heparina).

Los mastocitos son células residentes en la vía respiratoria (Church MK, 2003). En los sujetos con rinitis alérgica estacional durante el periodo de polinización se ha observado un incremento en el número de estas células que infiltran el epitelio respiratorio (Bentley AM, 1992; Bradding P, 1993). En los sujetos con rinitis alérgica persistente los mastocitos pueden contribuir a la cronicidad de la inflamación porque, además de producir citoquinas (Bradding P, 1993; Pawankar R, 1997), que atraen y activan células que participan en la llamada respuesta tardía, inducen la síntesis de IgE por las células B mediante la producción de citoquinas necesarias (IL-4 e IL-13) y la expresión de CD40L en su membrana, que genera la “segunda señal” estimuladora.

Los mastocitos activados liberan los productos contenidos en sus gránulos y también sintetizan de *ново* mediadores lipídicos a partir de los fosfolípidos de la membrana, como leucotrienos y prostaglandinas, principalmente PGD<sub>2</sub>, que pueden detectarse en la secreción nasal (Howarth PH, 2003; Salib RJ, 2004; Wang D, 1997).

El principal responsable del reclutamiento y la retención de los mastocitos en el epitelio es el factor transformador del crecimiento-beta (TGF- $\beta$ ), producido por las células epiteliales, aunque algunos alérgenos con actividad proteolítica, como los ácaros, también pueden estimular la liberación de TGF- $\beta$  mediante hidrólisis (Salib RJ, 2005). A su vez, el TNF- $\alpha$  segregado de los mastocitos estimula la síntesis y la liberación del TGF- $\beta$ , y, probablemente, las interacciones entre los mastocitos y las células epiteliales tienen un papel inmunomodulador muy importante (Salib RJ, 2005).

**-Basófilos:** son células de origen hematopoyético (CD34+) que, a diferencia de los mastocitos, completan su diferenciación en la médula ósea y entran en la circulación como células maduras. La IL-3 parece ser un factor importante para su desarrollo, aunque podrían influir otros factores de crecimiento (Figura 4).



**Figura 4:** basófilo circulante en sangre periférica.

Los basófilos pueden activarse por un mecanismo inmunológico, ya que expresan en su superficie receptores de alta [Fc $\epsilon$ RI] y baja afinidad [Fc $\epsilon$ RII] para la IgE, y por otros estímulos, como las anafilotoxinas (C5a y C3a), el péptido bacteriano f-met-leu-phe, el

factor activador de plaquetas (PAF del inglés *platelet-activating factor*), la proteína básica del eosinófilo (MBP del inglés *mayor basic protein*), diversas citoquinas y algunos fármacos. Estas células son escasas en la mucosa nasal pero, en los sujetos con rinitis alérgica, infiltran la mucosa tras la exposición al alérgeno. Pueden detectarse en el epitelio y en la lámina propia a los 60 minutos y persisten hasta una semana (KleinJan A, 2000). También pueden detectarse en el lavado nasal. Participan en la fase tardía de la reacción alérgica y potencian la síntesis de IgE, ya que liberan IL-4 e IL-13. No sintetizan PGD<sub>2</sub>, pero generan LTC<sub>4</sub> en cantidad similar a los mastocitos (Howarth PH, 2003).

**-Eosinófilos:** se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética (CD34+) y comparten linaje con los basófilos. Se diferencian en la médula ósea en respuesta a citoquinas, principalmente la IL-5.

Las células maduras poseen gránulos intracelulares que contienen proteínas proinflamatorias (Bousquet J, 2001), como la MBP, la peroxidasa del eosinófilo (EPO del inglés *eosinophil peroxidase*), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP del inglés *eosinophil cationic protein*), la neurotoxina derivada del eosinófilo (END del inglés *eosinophil-derived neurotoxin*) y la  $\beta$ -glucuronidasa.

Tras su activación, se produce la síntesis y liberación de: citoquinas (IL-3, IL-5 que estimula la llegada de más eosinófilos, GM-CSF ), quimioquinas (RANTES, IL-8, MIP-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1), mediadores lipídicos (CysLT, PGE<sub>1</sub>, tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) y PAF), radicales intermedios de oxígeno, y diferentes enzimas (cristales proteicos de Charcot-Leyden y la histaminasa) (Bousquet J, 2001).

En los sujetos con rinitis alérgica, los eosinófilos infiltran la submucosa y el epitelio y se detectan en la secreción nasal. En ocasiones, tras la exposición al alérgeno, se detectan células progenitoras de eosinófilos en la mucosa nasal que completan su maduración a nivel local (Cameron L, 2000; Sergejeva S, 2005). Además, diversos factores quimiotácticos atraen los eosinófilos a la mucosa nasal, como la IL-5, el RANTES y la eotaxina, que posiblemente sea la más importante.

Los eosinófilos de los pacientes con rinitis alérgica están activados (Bentley AM, 1992; Erjefalt JS, 1999), lo que provoca cambios en su morfología y en su función. Los eosinófilos desempeñan un papel importante en la respuesta tardía y en la inflamación crónica (Wang D, 1997; Knani J, 1992). Durante esta fase producen la liberación de proteínas citotóxicas como la ECP y la MBP que lesionan las células epiteliales nasales, enlentecen y desorganizan el movimiento ciliar, y producen la lisis celular.

**-Neutrófilos y linfocitos:** estas células se encuentran frecuentemente en la mucosa nasal. Los neutrófilos, al igual que los eosinófilos, tienen una notable tendencia a emigrar a través del epitelio superficial y a menudo se encuentran en la secreción nasal normal (Christodouloupoulos P, 2000; Mérida Fernández C, 2004).

Los linfocitos son unas de las principales células que regulan la respuesta inmunológica. Existen dos tipos de células T cooperadoras (Th) que provienen de la diferenciación de células T inmaduras Th0. En función del tipo de señal implicada, pueden diferenciarse en Th1 o Th2, con dos patrones diferentes de producción de citoquinas: 1) Células Th1: liberan principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2 y participan en reacciones de hipersensibilidad retardada. 2) Células Th2: liberan principalmente IL-4 e IL-5, y participan en reacciones alérgicas IgE mediadas.

La inflamación de la mucosa nasal en la rinitis alérgica se caracteriza por una infiltración de linfocitos T activos (CD4+ y CD25+) en la submucosa y en el epitelio (Bousquet J, 2001). La rinitis alérgica perenne se caracteriza por un incremento selectivo en el número de células T memoria CD4+ (Pawankar RU, 1995; Varga EM, 1999), así como de células T CD3+4-8-, células B y células T  $\gamma/\delta$  en la mucosa nasal (Pawankar RU, 1995).

**-Macrófagos y células dendríticas:** la mucosa respiratoria es rica en células dendríticas y macrófagos, existiendo diferencias en su número entre las vías respiratorias superiores e inferiores. Los macrófagos alveolares están presentes en más del 90% de los lavados broncoalveolares, mientras que los macrófagos del epitelio nasal sólo alcanzan el 1-2% del total de células (Bousquet J, 2001). Sin embargo,

en pacientes con rinitis alérgica tanto estacional como perenne también se encuentran aumentados significativamente (Bousquet J, 2001).

En la nariz, las células de Langerhans representan un importante grupo de células dendríticas, caracterizadas por la expresión de CD1 y gránulos Birbeck (Fokkens WJ, 1989). Estas células aumentan tras la provocación nasal con alérgeno (Godthelp T, 1996) y en pacientes con rinitis alérgica (Fokkens WJ, 1989; Fokkens WJ, 1991).

Las células dendríticas son una potente población de APC, especializadas en la presentación del antígeno a células T vírgenes o no estimuladas y en liberar señales de activación de células T memoria, específicas del antígeno (Banchereau J, 1998). En la respuesta inmune primaria las células dendríticas del tracto respiratorio son las principales CPA, siendo esenciales para la presentación de alérgenos inhalados a células Th2 (Bousquet J, 2001).

**-Células endoteliales:** estas células participan activamente en la respuesta inflamatoria. Tras su activación liberan citoquinas, quimioquinas y expresan moléculas de adhesión que permiten la atracción al foco de la respuesta alérgica de otras células, fundamentalmente eosinófilos. En los sujetos con rinitis alérgica existe un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1 y VAM-1) en las células endoteliales y en los eosinófilos respecto a sujetos no atópicos (Salib RJ, 2005; Montefort S, 1992).

### 3.4. Vascularización de las fosas nasales

La sangre arterial llega a la lámina propia de la mucosa nasal vía arteriolas, que son vasos sin lámina elástica interna y con una membrana basal porosa que aumenta la permeabilidad y el paso de fármacos (Scadding GK, 2002). Desde las arteriolas, alcanzará el sistema de drenaje venoso a través de la red superficial de capilares o de las anastomosis arteriovenosas.

La red superficial de capilares fenestrados se sitúa justo por debajo de la membrana basal, rodeando al tejido glandular. La estructura de los vasos sanguíneos nasales es de una importancia decisiva en la aparición de los síntomas de rinitis. Las



fenestraciones permiten la extravasación o exudación plasmática que es esencial para la nutrición del epitelio y el tejido glandular, y para la defensa inmunológica local.

### **3.5. Inervación de las fosas nasales**

La inervación sensitiva o aferente la realizan el nervio trigémino y el nervio olfatorio. Las terminaciones nerviosas del nervio olfatorio forman el área olfatoria en el techo de las fosas nasales y actúa como quimiorreceptor del aire inspirado, receptor del sentido del olfato y facilitador del sentido del gusto. Las ramas oftálmica y maxilar del nervio trigémino recogen fibras nerviosas sensitivas de la mucosa nasal y del vestíbulo nasal de tacto, dolor, temperatura, picor y apreciación del flujo aéreo nasal. Estos nervios también contienen fibras no-adrenérgica no-colinérgica (NANC) sensibles a estímulos químicos y responsables del inicio del estornudo y de la hipersecreción nasal refleja. Las fibras sensoriales del trigémino contienen neuropéptidos en las terminaciones nerviosas que rodean al ganglio esfenopalatino y a los vasos sanguíneos de la mucosa nasal. Algunos autores apoyan la idea de que estos neuropéptidos intervienen en la vasodilatación, extravasación plasmática, inflamación neurogénica e interacción nervio-mastocito. De hecho, la presencia de hiperreactividad nasal no alérgeno-específica en la provocación nasal ha sido utilizada por alguno de ellos para explicar una etiología neurológica de la rinitis idiopática (Togias A, 2011).

La inervación eferente está a cargo del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. Los neurotransmisores de las terminaciones parasimpáticas pueden ser liberados por reflejos axónicos produciendo vasodilatación, secreción glandular y engrosamiento de la mucosa nasal. Estos reflejos pueden ser activados tanto por sustancias irritantes como por mediadores inflamatorios. Los neurotransmisores simpáticos son la noradrenalina y el neuropéptido Y, de acción vasoconstrictora (Bousquet J, 2001; Howarth PH, 2003; Mérida Fernández C, 2004).

### **3.6. Fisiología de las fosas nasales**

Las fosas nasales tienen función como órgano respiratorio, de protección general y olfatorio (Mérida Fernández C, 2004; Scadding GK, 2002).



Como órgano respiratorio interviene en la canalización del aire inspirado, su calentamiento, humidificación y filtración. (Howarth PH, 2003; Mérida Fernández C, 2004).

La resistencia nasal depende del calibre del conducto y de sus distintas estrecheces. Se regula fisiológicamente por la vasomotricidad de arteriolas, anastomosis arteriovenosas y venas musculares. No es uniforme en ambas fosas, existiendo una fosa “funcionante” que bascula y un reflejo circunscrito a la propia fosa nasal que origina un ciclo nasal cada 2 a 5 horas (Mérida Fernández C, 2004).

La filtración es una función compleja, que libera de la mayor parte de las impurezas el aire inhalado diariamente. En ella intervienen factores físicos como los cambios de diámetro de las fosas, las turbulencias del aire inspirado en los cornetes y, fundamentalmente el barrido ciliar y la acción de los productos del moco (lisozimas, lactoferrina, interferón, anticuerpos, etc.) (Mérida Fernández C, 2004). Así un flujo aéreo turbulento favorece el impacto en la mucosa de partículas de tamaño superior a 2  $\mu\text{m}$ . Las secreciones nasales representan un sistema de protección frente a gran cantidad de bacterias, virus y sustancias químicas (Mérida Fernández C, 2004).

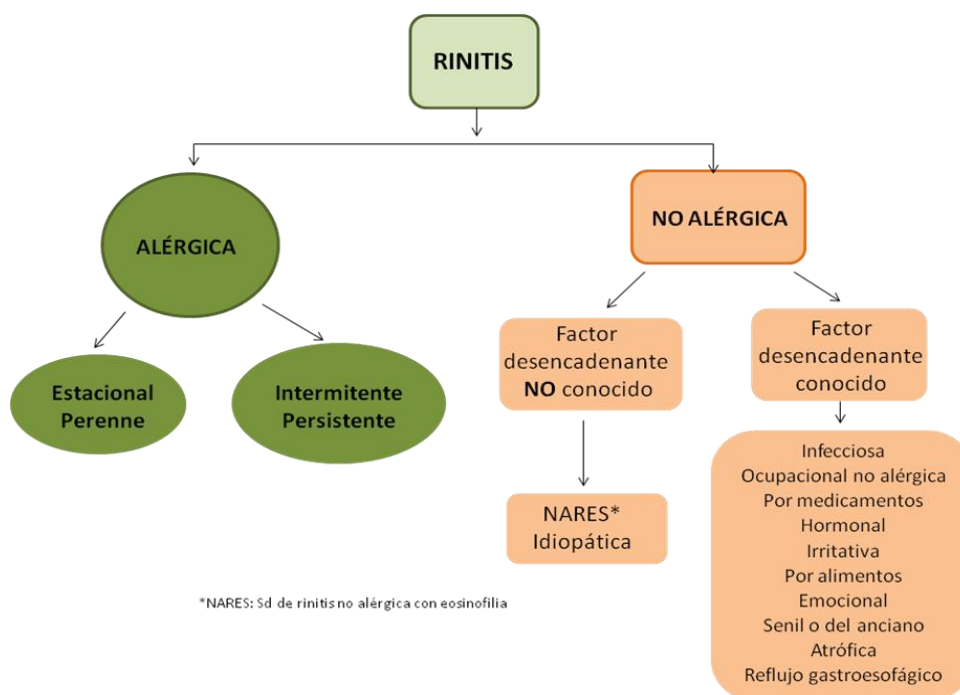
Por último, la función nasal como receptor de estímulos olfatorios se va a ver alterada cuando existen cambios en la velocidad, resistencia o el tipo de circulación del flujo a través de las fosas nasales, hechos que ocurren en la rinitis (Mérida Fernández C 2004).

## **4. CLASIFICACIÓN DE LA RINITIS**

### **4.1. Aspectos generales: clasificación de la rinitis alérgica y no alérgica**

A lo largo de los años se han propuesto diversas clasificaciones de rinitis, muchas de ellas fruto de consensos de expertos. Las de mayor trascendencia han sido publicadas por la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica en 1994 (*Internacional Rhinitis Management Working Group. International Consensus Report on the Diagnosis and Management of Rhinitis. Allergy 1994*), modificada posteriormente en el año 2000, y la redactada por autores americanos en 1998. En el consenso publicado en 1994 se clasificó la rinitis en “alérgica” (estacional y perenne), “infecciosa” y “otras rinitis”.

Sin embargo, la más novedosa es la clasificación etiológica de la rinitis propuesta en 2001 en el documento ARIA (del inglés Allergic Rhinitis and its impact on Asthma) (Bousquet J, 2001) y posteriormente actualizada (Bousquet J, 2008), fruto de un grupo de trabajo internacional integrado por un panel pluridisciplinario de expertos internacionales en rinitis, en colaboración con la OMS (Organización Mundial de la Salud) y auspiciado por numerosas sociedades científicas entre las que se hallan la AAAAI (del inglés *The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*), la EAACI (del inglés *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*), Interasma y la SEAIC (Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica). Así, la rinitis se ha clasificado desde un punto de vista etiológico en rinitis alérgica y rinitis no alérgica (Bousquet J, 2008) (Figura 5).



**Figura 5:** Clasificación etiológica de la rinitis (tomado de Bousquet J, 2008).

#### 4.2. Clasificación de la rinitis alérgica (RA)

Tradicionalmente, la rinitis alérgica se ha clasificado a su vez, teniendo en cuenta el periodo de exposición al alérgeno, en rinitis alérgica estacional, perenne y ocupacional. La rinitis alérgica estacional se debe a la exposición a una amplia variedad de

alérgenos presentes en la atmósfera durante una estación concreta, como ocurre con la mayoría de los pólenes y algunos hongos. La rinitis alérgica perenne está causada por alérgenos existentes en el ambiente fundamentalmente doméstico durante todo el año. Generalmente son alérgenos “de interior”, como los ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos, cucarachas, entre otros. La rinitis alérgica ocupacional se caracteriza por la aparición de estornudos, obstrucción nasal, prurito e hidrorrea en relación con la exposición a diversas sustancias de distinta naturaleza presentes en el medio laboral. Suele ser la primera manifestación de enfermedad respiratoria alérgica ocupacional y se considera por si misma un factor de riesgo para el desarrollo de asma profesional (Bernstein DI, 2006).

Sin embargo, esta clasificación tiene algunos inconvenientes (Bousquet J 2001; Mygind N, 1983) pues, en determinadas zonas geográficas, los llamados alérgenos “estacionales” están presentes durante la mayor parte del año. Por ejemplo, los hongos en los climas tropicales y el polen de parietaria en el área mediterránea. Por otra parte, los “alérgenos perennes” no siempre están presentes en el medio, y el paciente puede exponerse a ellos de forma intermitente o incluso su concentración puede estar sometida a variaciones estacionales, como ocurre con las poblaciones de ácaros. Así mismo, es cada vez más frecuente que los sujetos estén polisensibilizados, y por lo tanto, que presenten síntomas durante largos periodos, no pudiendo diferenciarse claramente la rinitis perenne de la estacional (Ciprandi G, 2005). Por ello, en el documento ARIA, actualizado en 2008, se propone una nueva subdivisión de la rinitis alérgica en “intermitente” y “persistente”. Ésto ha supuesto un cambio conceptual importante, ya que esta subdivisión no depende del alérgeno al que el paciente está sensibilizado, sino de la duración y de la frecuencia de los síntomas. A su vez la rinitis se clasifica en “leve” y “moderada-grave”, en función de la intensidad de las manifestaciones clínicas y de la repercusión sobre la calidad de vida, teniendo en cuenta cuatro ítems: afectación del sueño, incapacidad para realizar actividades diarias de trabajo y/o estudio, o de la vida diaria como ocio y deportes, y presencia de síntomas muy

molestos. La ausencia de estos ítems define la enfermedad como leve y la presencia de al menos uno la define como moderada/grave (Tabla 1).

CLASIFICACIÓN DE LA RINITIS ALÉRGICA	
• “Intermitente” significa que los síntomas están presentes:	
-menos de 4 días a la semana	
-durante menos de 4 semanas consecutivas	
• “Persistente” significa que los síntomas están presentes:	
-más de 4 días a la semana	
-durante más de 4 semanas consecutivas	
• “Leve” significa que no está presente ninguna de las circunstancias siguientes:	
-trastorno del sueño	
-deterioro de las actividades diarias, de ocio y/o deportivas	
-deterioro del rendimiento escolar o laboral	
-síntomas molestos	
• “moderada-grave” significa que está presente una de las circunstancias siguientes:	
-trastorno del sueño	
-deterioro de las actividades diarias, de ocio y/o deportivas	
-deterioro del rendimiento escolar o laboral	
-síntomas molestos	

**Tabla 1:** Clasificación de la rinitis alérgica. Tomado de Bousquet J, 2008.

No obstante, ni el documento de 2001 ni el de 2008 hacían ninguna distinción entre moderada o grave. En este sentido, Valero y col. (Valero A, 2007) encontraron una diferencia estadísticamente significativa asociando el efecto de la intensidad de los síntomas sobre la alteración de la calidad de vida cuando los pacientes presentaban uno, dos, tres ó los cuatro ítems. Dicha diferencia sirvió a los autores para proponer una división de la categoría (Tabla 2).

	Intermitente	Persistente
	≤ 4 semanas de duración o ≤ 4 días/semana	> 4 semanas y > 4 días/semana
Leve	ningún ítem afectado	ningún ítem afectado
Moderada	entre 1 y 3 ítems afectados	Entre 1 y 3 ítems afectados
Grave	4 ítems afectados	4 ítems afectados

**Tabla 2:** Clasificación de la rinitis alérgica propuesta por Valero y col.,2007

La validez de la nueva clasificación ARIA es desconocida (Demoly P, 2003) ya que, cuando fue propuesta, no contaba con el aval de su utilización en la práctica clínica diaria, ni con el respaldo de estudios clínicos ni epidemiológicos. Recientemente han aparecido algunas publicaciones en este sentido (Bauchau V, 2005; Demoly P, 2003; Khanna P, 2005), pero aún no se disponen de suficientes datos para saber si con el tiempo la clasificación ARIA desbancará la tradicional. Aunque parece más razonable clasificar la rinitis en función de la duración, la frecuencia y la intensidad de los síntomas, son necesarios más estudios para identificar las características de los pacientes con rinitis intermitente y persistente y determinar la validez y la utilidad práctica propuesta por ARIA.

No obstante, la clasificación de la rinitis alérgica en estacional y perenne (Ciprandi G, 2005), se continúa empleando en la actualidad. Es importante hacer hincapié en que ambas clasificaciones no son análogas, es decir, perenne no es sinónimo de persistente, ni estacional de intermitente. De hecho, según algunos estudios realizados en países europeos (Bauchau V, 2005; Demoly P, 2003) aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados de rinitis estacional tienen síntomas persistentes y un 50% de los sujetos con rinitis perenne tienen clínica intermitente. En el trabajo publicado por Bauchau y cols. (Bauchau V, 2005), el patrón de sensibilización es diferente en la clasificación ARIA. Mientras que en los pacientes con rinitis perenne están sensibilizados principalmente a ácaros y epitelios, y los pacientes con rinitis estacional a pólenes o mohos de exterior, los pólenes predominan en la rinitis persistente y los ácaros en la intermitente. Sin embargo, en un estudio realizado por Morales y cols. en 2005 (Morales C, 2005) no encontraron diferencias significativas en la sensibilización a los diferentes alérgenos en los sujetos con rinitis intermitente frente a los sujetos con rinitis persistente. Mientras que el asma se asocia con más frecuencia al diagnóstico de rinitis alérgica perenne que al de rinitis alérgica estacional, no hay diferencias entre los pacientes diagnosticados de rinitis persistente o intermitente (Bauchau V, 2005; Morales C 2005). Ésto refleja la gran importancia de la correcta detección del alérgeno o alérgenos

responsables de la rinitis alérgica de cada paciente, independientemente de que el curso de la enfermedad sea persistente o intermitente, ya no sólo desde el punto de vista del abordaje terapéutico más eficaz (medidas de evitación, tratamiento sintomático, inmunoterapia alérgeno-específica) sino también desde la profilaxis de la aparición de comorbilidades asociadas como el asma bronquial o la conjuntivitis.

### **4.3. Clasificación de la rinitis no alérgica (RNA)**

La RNA es un término que engloba a un grupo muy heterogéneo que puede ser clasificado a su vez en dos grandes subgrupos: a) RNA con factor desencadenante conocido, b) RNA con factor desencadenante desconocido (Salib RJ, 2005), siendo las más frecuentes el síndrome de rinitis no alérgica con eosinofilia (NARES) y la rinitis idiopática (RI) (Settipane RA, 2003).

#### **4.3.1. Clasificación de la RNA con factor desencadenante conocido:**

##### **-Rinitis infecciosa**

Se reconocen cuatro tipos principales de rinitis o rinosinusitis infecciosa: aguda, aguda recurrente, crónica y con exacerbaciones agudas de la enfermedad crónica.

La rinitis de origen viral es la causa más frecuente de síntomas nasales a nivel mundial (Bousquet J, 2001), afectando a todos los grupos de edad. Los virus generalmente implicados son adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la influenza y rinovirus. Cursa con rinorrea profusa, estornudos, obstrucción, sensación de escozor o quemazón y habitualmente es autolimitada. Se estima que entre el 0,5 y el 2% de las infecciones víricas del aparato respiratorio superior progresan hacia una infección bacteriana (Gwaitney J, 1996) aunque también puede haber rinitis de origen bacteriano *de novo*. Esta generalmente afecta a los senos paranasales, cursando con intensa obstrucción nasal, rinorrea mucopurulenta, dolor facial y ocasionalmente fiebre. La citología del exudado nasal muestra predominio de neutrófilos. Las bacterias más frecuentemente implicadas son *Streptococcus pneumoniae* (20-35%) y *Haemophilus influenza* (6-26%) (Gwaaltney J, 1992), aunque en ocasiones pueden estar producidas por otros gérmenes (Bousquet J, 2001; Gwaitney J, 1992).

Diversos hongos también pueden producir infecciones nasales y sinusales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Los más frecuentemente implicados son los del género *Aspergillus* (Manning SC, 1998).

Existen una serie de factores que pueden actuar como predisponentes de las infecciones rinosinusales crónicas como son las alteraciones en la función mucociliar, las inmunodeficiencias y la alergia (Lund VJ, 1991).

#### **- Rinitis ocupacional no alérgica**

Esta entidad se produce como respuesta a la inhalación de agentes presentes en el medio laboral y es debida a una respuesta a sustancias irritantes (Gautrin D, 2006).

#### **-Rinitis inducida por fármacos**

Existe una gran variedad de medicamentos que, como consecuencia de su actividad farmacológica, son capaces de producir síntomas nasales, entre los que se encuentran los hipotensores como la reserpina (Girgis IH, 1974), guanetidina (Bauer GE, 1973), fentolamina (Gerth-van-Wijk R, 1991), metildopa (Bauer GE, 1973), hidralacina, IECAs (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) (Proud D, 1990), antagonistas de los receptores alfa-adrenérgicos, betabloqueantes orales o tópicos oculares (Kauffman HS, 1986), agonistas beta-adrenérgicos, neurolépticos como la clorpromacina, haloperidol, cocaína y anfetaminas; los anticonceptivos orales y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Stevenson DD, 2006).

Una forma específica y muy frecuente de este tipo de rinitis es la que aparece como consecuencia de la utilización durante largo tiempo de los vasoconstrictores tópicos nasales (Scadding GK, 1995) y se caracteriza por una hipertrofia inflamatoria de la mucosa nasal y una obstrucción intensa como síntoma fundamental.

#### **-Rinitis hormonal**

Son conocidos los cambios en la mucosa nasal durante el ciclo menstrual, la pubertad y el embarazo, que originan un aumento de la actividad de las glándulas seromucosas y un aumento del volumen sanguíneo nasal, produciendo retención hídrica y edema submucoso con la consiguiente obstrucción nasal (Howarth PH, 2003; Mora González A, 2004;

Olivé Pérez A, 1995). La rinitis hormonal también se asocia a otras patologías endocrinas como en hipotiroidismo (Incaudo G, 1991) y la acromegalia (Fatti LM, 2001).

Por otro lado, la privación hormonal que ocurre durante la menopausia puede ser la responsable de la rinitis atrófica que padecen mujeres postmenopáusicas. Así mismo, el déficit de testosterona en los varones de edad avanzada parece que es la causa de la rinorrea acuosa persistente de la llamada “rinitis del anciano” o “rinitis senil” (Howarth PH, 2003).

### **- Rinitis por irritantes**

Es secundaria a la exposición a estímulos físicos o químicos inespecíficos. Se ha descrito por la inhalación de vapores irritantes, ya sean de origen profesional, contaminación, etc, por exposición al aire frío y seco (“nariz del esquiador”) o por la ingesta de comida caliente y picante (“rinitis gustatoria”). Aparece en sujetos con membranas mucosas sensibles e incluso en personas normales si la concentración del desencadenante irritante es suficientemente alta (Leroyer C,1999). No está clara la diferencia entre una respuesta fisiológica normal y patológica (Bousquet J, 2008) existiendo además poca información sobre los efectos agudos o crónicos por contaminantes del aire en la mucosa nasal (Calderón-Garcidueñas L, 1992).

### **-Rinitis por alimentos**

Los alimentos pueden producir rinitis por diversos mecanismos. La alergia alimentaria puede dar lugar a síntomas de rinitis, pero casi nunca aislados, apareciendo en la mayoría de los casos asociados a manifestaciones gastrointestinales, cutáneas o sistémicas. El alcohol puede producir síntomas nasales por mecanismos no alérgicos, induciendo vasodilatación y congestión nasal fisiológica. Existe una forma de rinitis denominada “rinitis gustatoria”, mencionada anteriormente, desencadenada por la ingestión de alimentos calientes o fuertemente especiados (Rhapael G,1989), es de mecanismo vagal y cursa con rinorrea acuosa profusa, y a veces, enrojecimiento facial con sudoración.



### ***-Rinitis emocional***

El estrés y otras emociones como la excitación sexual pueden desencadenar síntomas nasales probablemente a través de la estimulación del sistema nervioso autónomo (Bousquet J, 2008).

### ***-Rinitis atrófica***

También llamada “ocena”, cursa con congestión nasal, hiposmia y mal olor permanente en la nariz. Es más frecuente en edades avanzadas y se caracteriza por la progresiva atrofia de la mucosa y del hueso de los cornetes así como por la producción de abundantes costras malolientes. La cavidad de las fosas nasales aumenta de tamaño a pesar de lo cual el sujeto tiene sensación de obstrucción que no se objetiva por rinomanometría. Su etiología es desconocida, aunque ha sido atribuida a infección por diversas bacterias (Bousquet J, 2008; Mora González A, 2004).

#### **4.3.2 Clasificación de la RNA con factor desencadenante desconocido:**

La rinitis persistente no-alérgica con eosinofilia es un síndrome heterogéneo compuesto por al menos dos subgrupos: El síndrome rinitis no-alérgica con eosinofilia (NARES) y la idiosincrasia a AINEs (Fokkens WJ, 2002).

### ***- Síndrome de rinitis no alérgica con eosinofilia (NARES)***

Fue descrito a principios de la década de los 80 (Jacobs RL, 1981; Mullarkey MF, 1980) y aunque probablemente no representa una entidad en sí misma, puede ser considerado como un subgrupo de rinitis idiopática. Se caracteriza por la presencia de eosinofilia nasal y síntomas persistentes de prurito nasal, estornudos, rinorrea, obstrucción nasal y ocasionalmente pérdida de olfato y gusto, siendo los dos primeros junto con los síntomas conjuntivales menos frecuentes que en la rinitis alérgica (Bousquet J, 2001; Mora González A, 2004). Se asocia en aproximadamente el 50% de los casos a hiperreactividad bronquial (Leone C, 1997), con menor frecuencia a asma bronquial intrínseco (Bousquet J, 2008; Mora González A, 2004) y en más de una tercera parte de los casos a pólipos nasosinusales eosinofílicos, frecuentemente localizados en la pared lateral de las fosas nasales alrededor del meato medio. La asociación de poliposis naso-sinusal, asma e

idiosincrasia a AINEs se denomina “síndrome de ASA-triada”, descrito en 1922 por Vidal (Vidal F, 1922) y posteriormente por Samter (Samter M, 1968). Moneret-Vautrin DA y col, han propuesto que en algunos casos el NARES puede ser una fase temprana del ASA-triada (Moneret-Vautrin DA, 1990).

En la fisiopatología del NARES podríamos distinguir tres estadios (Moneret-Vautrin DA, 1992): migración de los eosinófilos de los vasos a las secreciones, retención y activación de los eosinófilos en la mucosa nasal por un mecanismo no identificado y finalmente la poliposis nasal.

### ***-Rinitis idiopática (RI)***

Dentro de la rinitis no alérgica, existe un subgrupo importante de pacientes con rinitis de causa desconocida a cuyo diagnóstico se llega tras un proceso de exclusión de otras posibles causas de rinitis, que se denomina rinitis idiopática (RI) (Bousquet J, 2001; van Rijswijk, 2005). La RI es un término que engloba a un grupo de pacientes con rinitis con diferentes mecanismos fisiopatológicos. Si bien se han realizado numerosos estudios etiopatogénicos en rinitis alérgica (Bousquet J, 2001; Pawankar R, 2008; Takhar P, 2005), los mecanismos etiopatogénicos responsables de la rinitis idiopática son poco conocidos, constituyendo el subgrupo de RNA más heterogéneo, pudiendo haber diferentes mecanismos fisiopatológicos. En este sentido, varios estudios han demostrado la intervención de diferentes mecanismos neurogénicos en pacientes con RI; los más importantes incluyen: desequilibrio entre los sistemas nerviosos parasimpático y simpático, hiperactividad no-adrenérgica, no-colinérgica (NANC), hiperestesia o disestesia del sistema nervioso central y la alta concentración de óxido nítrico sintasa en las células musculares lisas de los senos cavernosos (Bousquet J, 2008; Salib RJ, 2008).

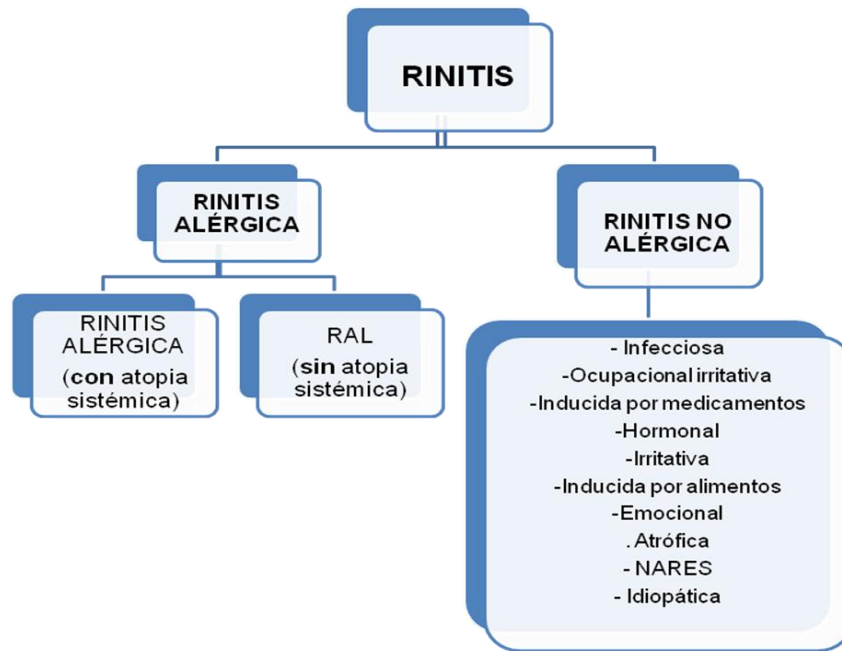
Otro de los mecanismos fisiopatológicos de RI estudiados ha sido la presencia o ausencia de inflamación en la mucosa nasal de estos pacientes, siendo un tema de controversia en la literatura. Mientras algunos autores han demostrado la existencia de un proceso inflamatorio crónico con infiltración eosinofílica de la mucosa nasal y buena

respuesta a corticoides intranasales (Small P, 1982), otros no han encontrado infiltrado de células inflamatorias en las biopsias de mucosa nasal de pacientes con RI (Blom HM, 1997; van Rijswijk JB, 2003). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden ser explicados por la gran heterogeneidad de la RI.

#### **4.4. Importancia de la rinitis alérgica local (RAL) en la clasificación de la RA:**

Diversos estudios recientes (Powe,2001; Powe,2004; Rondón,2007; Rondón,2008) han demostrado que un subgrupo de pacientes con clínica de rinitis previamente diagnosticados de RI presenta una forma localizada de alergia en la mucosa nasal en ausencia de atopia sistémica (prick test e IgE sérica específica negativos) con un infiltrado inflamatorio nasal muy similar al de la rinitis alérgica. Esta nueva entidad clínica de rinitis ha sido denominada rinitis alérgica local (RAL) (Rondón, 2009) o “entopia” (Powe, 2003).

Tras la descripción de este nuevo fenotipo de rinitis, se ha sugerido que el enfoque diagnóstico clásico de la rinitis en alérgica o no alérgica basada en la presencia de pruebas cutáneas y/o IgE específica en suero puede ser insuficiente. Así lo demuestran resultados obtenidos de varios de estos trabajos, en los que un número significativo de pacientes (47-62.5%) que presentaban clínica compatible de rinitis alérgica, tanto estacional (Rondón, 2008; Rondón, 2009; Wedbäck, 2005) como perenne (Carney, 2002; Rondón, 2007; López S, 2010), que previamente habían sido diagnosticados de RI o RNA, fueron finalmente diagnosticados de RAL. Estos hallazgos indican que la RAL es una enfermedad no adecuadamente clasificada en el pasado y su descripción ha motivado finalmente que se proponga una nueva clasificación etiológica de la rinitis (Rondón, 2010) (Figura 6).



**Figura 6:** Nueva clasificación etiológica de la rinitis (Rondón, 2010).

Esta nueva propuesta de clasificación de la rinitis alérgica permite ubicar a la RAL como una entidad independiente y bien definida, permitiendo a su vez un adecuado diagnóstico y con él un correcto abordaje terapéutico de los pacientes, tanto de la patología inflamatoria nasal propiamente dicha como de las posibles comorbilidades asociadas (conjuntivitis, asma bronquial,...).

Así, teniendo en cuenta la clasificación tradicional y la expuesta en el documento ARIA, Rondón y col. (Rondón, 2012) proponen en 2012 una adaptación de la más reciente de estas clasificaciones (Tabla 3). En esta clasificación, la rinitis alérgica clásica y la rinitis alérgica local se presentan como entidades diferenciadas (con o sin atopia sistémica) y a su vez agrupadas según el tiempo de exposición al alérgeno (clasificación clásica) y según la duración y severidad de los síntomas (clasificación ARIA).

<b>1. Rinitis alérgica</b>
• Rinitis alérgica con atopia sistémica
<u>i Clasificación clásica</u>
1. tiempo de exposición al/los alérgenos: perenne, estacional y ocupacional
<u>ii Clasificación ARIA</u>
1. duración de los síntomas: persistente e intermitente
2. severidad de los síntomas: leve, moderada y severa
• Rinitis alérgica local (sin atopia sistémica)
<u>i Clasificación clásica</u>
1. tiempo de exposición al/los alérgenos: perenne, estacional y ocupacional
<u>ii Clasificación ARIA</u>
1. duración de los síntomas: persistente e intermitente
2. severidad de los síntomas: leve, moderada y severa
<b>2. Rinitis no alérgica</b>
• infecciosa
• ocupacional
• inducida por fármacos
• hormonal
• por irritantes
• por alimentos
• emocional
• atrófica
• NARES
• Rinitis idiopática

**Tabla 3:** Clasificación etiológica de la rinitis, adaptada de Rondón y col. (Rondón, JACI 2012).

## 5. RINITIS ALÉRGICA SISTÉMICA Y LOCAL

### 5.1 Epidemiología de la rinitis alérgica sistémica y local

La rinitis alérgica representa un problema global de salud que afecta al 10-25% de la población (Magnussen H, 1993; Naclerio N, 1991; Wultrich B, 1995). Haciendo una estimación conservadora, podemos afirmar que la rinitis alérgica afecta a 500 millones de sujetos en todo el mundo (Bousquet J, 2008). En algunos países estas cifras son incluso más altas, afectando a cerca del 40% de la población pediátrica (Strachan D, 1997; Wrigth AL, 1994) y entorno al 50% de los adolescentes (Sears MR, 1993). La rinitis alérgica se encuentra entre los primeros 10 motivos de consulta de los médicos de atención primaria en Estados Unidos (Gregory C, 1999).

La prevalencia de la rinitis alérgica ha ido aumentando considerablemente en los últimos 50 años, presentando cifras crecientes en la mayoría de ciudades del mundo y

particularmente en áreas con cifras bajas o medias de prevalencia de rinitis alérgica, permaneciendo sin cambios o incluso con cifras decrecientes en áreas de alta prevalencia (Bousquet J, 2008).

De acuerdo con los datos recogidos de los estudios llevados a cabo a partir de 1990 que incluyen a más de 100.000 sujetos, la cifra media de prevalencia de la rinitis alérgica estacional fue del 15%, con un rango entre 10'9 y 18'6% (Aas K, 1997). En Estados Unidos se calcula que la rinitis alérgica afecta a unos 58 millones de personas (Settipane RA, 2003).

Uno de los estudios epidemiológicos más ambiciosos es el ISAAC (*Internacional Study on Asthma and Allergies in Childhood*) (Ascher MI, 1998), diseñado para describir la prevalencia y gravedad del asma, de la rinitis y del eccema en niños de diferentes países y regiones, investigar los factores genéticos, ambientales y de atención médica y valorar las tendencias sobre prevalencia y gravedad en un futuro. En él participó una cohorte de 721.601 niños en dos grupos de edad: en el grupo de 13-14 años participaron 155 centros de 56 países con 463.801 niños, mientras que en el grupo de 6-7 años participaron 91 centros de 38 países con 257.800 niños. El estudio se realizó mediante un cuestionario y los resultados pusieron de manifiesto una gran dispersión de las cifras de prevalencia de rinitis que oscilaba, según los países, desde el 1,4% hasta el 28,9%. Además, se observó una correlación significativa entre la prevalencia de asma y rinitis. Así, los países con una prevalencia muy alta de asma (>30%) como Australia, nueva Zelanda y Reino Unido tenían una elevada prevalencia de rinitis (15-20%); y los países con muy baja prevalencia de asma (<5%) como Indonesia, Albania, Rumania, Georgia y Grecia, tenían baja prevalencia de rinitis.

Otro de los trabajos realizados en población pediátrica es el estudio SCARPOL (*Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution*), en el cual se analizó la rinitis en una población de 2.954 escolares. Este estudio demostró que los niños que crecieron en una granja tenían menos posibilidades de

sensibilizarse frente a aeroalérgenos comunes y de sufrir enfermedades alérgicas que los niños de familias no granjeras de los mismos pueblos (Braun-Fahriander C, 1999).

El estudio ECRHS (*European Community Respiratory Health Survey*) fue diseñado inicialmente para estimar variaciones en la prevalencia del asma pero, posteriormente, su cuestionario fue validado para la rinitis alérgica. En él participaron 127.500 adultos, con edades comprendidas entre 20 y 44 años. Los resultados de este estudio confirmaron la estrecha relación entre la positividad de tests cutáneos y la presencia de síntomas nasales alérgicos en la población general (Burney PG 1994; Annesi-Maesano I, 1998).

Otro estudio importante es el SAPALDIA, que se centra en los efectos sobre la salud de niveles bajo-moderados de polución. En él se incluyó una población adulta suiza, y se evidenció una prevalencia de rinitis alérgica del 13,5% (14,3% en hombre y 12,6% en mujeres), con una prevalencia de rinitis estacional del 9,1% (Wultrich B 1995; Tschoopp JM, 1998).

Bauchau y Durham (Bauchau V, 2004) han publicado recientemente los resultados de un estudio multicéntrico encaminado a determinar la prevalencia de la rinitis alérgica entre los adultos europeos. En dicho estudio participaron Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Reino Unido y España y se realizó entre febrero y abril del 2001. Se llevaron a cabo 9.646 entrevistas telefónicas. Se estableció el diagnóstico de presunción de rinitis alérgica en el 13% de los entrevistados. En una segunda etapa, llevada a cabo entre mayo y agosto de 2001, fueron sometidos a estudio alergológico 725 sujetos, confirmándose el diagnóstico de rinitis alérgica en 411 casos. Las cifras de prevalencia obtenidas variaron según los distintos países, desde el 17% de Italia hasta el 29% de Bélgica, con un promedio del 23%. Uno de los datos mas llamativos de este estudio fue que el 45% de los pacientes, en los que se confirmó la presencia de rinitis alérgica, no habían sido estudiados previamente y, por tanto, estaban sin diagnosticar.

Con respecto a la prevalencia en España, la sintomatología nasal fue el motivo de consulta del 55,5% de los pacientes atendidos en los servicios de alergia,

confirmándose el diagnóstico de rinitis en un 63,7% de los casos (SEAIC, 2005). En un estudio anterior (WAA, 1999) la prevalencia media fue el 10,1% y de acuerdo con los datos del estudio multicéntrico europeo citado anteriormente (Bauchau V, 2004), la prevalencia de rinitis alérgica en España fue del 22%.

Uno de los hechos más significativos en el campo de la alergología ha sido la constatación del aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas acaecido en las últimas décadas, constituyendo un serio problema de salud pública en la mayoría de los países industrializados (Ulrick CS, 2000). La rinitis alérgica es, sin duda, el proceso alérgico respiratorio más frecuente y, por tanto, su prevalencia ha sufrido el mismo proceso evolutivo.

#### **-Epidemiología, prevalencia e historia natural de la rinitis alérgica local (RAL)**

En los primeros estudios realizados en pacientes previamente diagnosticados de rinitis idiopática o NARES, la prevalencia de la RAL con respuesta positiva al TPN se estimó en el 54% (Rondón,2007). En un estudio similar realizado previamente por Carney y col. en 2002 también en pacientes con rinitis perenne, la prevalencia se estimó en el 62% (Carney,2002). En un grupo de pacientes con rinitis estacional, la prevalencia de RAL por gramíneas y olivo fue del 62.5% (Rondón, 2008).

Recientemente, Rondón y col. realizaron el primer estudio observacional de corte transversal para evaluar la prevalencia, el fenotipo y la relevancia clínica de la RAL. Entre una población de 3680 pacientes adultos que consultaron por síntomas de rinitis durante un año, se seleccionó una muestra aleatorizada de 428 pacientes. La prevalencia de RAL fue del 25.7%, la de RAS 63.1% y la de RNA 11.2% con una prevalencia total de RA (local y sistémica) del 88.8%. El diagnóstico diferencial entre RAL y RNA se realizó mediante TPN. Un hallazgo importante en este estudio fue que más del 36% de los pacientes con RAL confirmada habían comenzado con los síntomas durante la infancia (edad menor o igual a los 14 años).

Estos resultados indican que la RAL es una enfermedad frecuente, que puede afectar a uno de cada cuatro pacientes con rinitis (25,7%), que se presenta principalmente en



adultos jóvenes y puede iniciarse en la infancia. Sin embargo, es necesario realizar estudios prospectivos amplios, tanto en población adulta como pediátrica para precisar con más detalle en estos hallazgos.

Siendo la RAL una nueva entidad clínica, hasta hace poco tiempo erróneamente diagnosticada como RI, poco se conoce sobre su historia natural. Cabría por tanto preguntarse si la RAL y la RA clásica son entidades clínicas independientes o por el contrario la RAL es un primer escalón en la evolución natural hacia una alergia respiratoria (RAS y/o asma alérgica). En el estudio realizado en 2009 por Rondón y col. (Rondón,2009) en el que se reevaluaron a 180 pacientes con RNA diagnosticados en el periodo 2000-2004, se observó que la RNA presentaba una peor evolución clínica que la rinitis alérgica. El 52% de los pacientes con RNA refería haber empeorado, un 8% expresaban haber mejorado y en ningún caso se detectó desaparición de la rinitis. Estos datos difieren, en cambio, de los detectados por otros autores en pacientes con rinitis alérgica clásica, donde la evolución clínica suele ser mejor, con mejoría de los síntomas en el 39% de los pacientes (Jenssen M,1997) o incluso desaparición de la rinitis, en un 1-10% (Broder I,1974; Jenssen M,1997; Pedersen PA,1981). En el estudio de Rondón (Rondón,2009), un 24% de los pacientes con RNA asociaron nuevas enfermedades respiratorias (principalmente asma, conjuntivitis y rinosinusitis) y el mismo porcentaje desarrolló rinitis alérgica con clínica claramente relacionada con la exposición a aeroalérgenos y con pruebas cutáneas y/o IgE específica sérica positiva. Sin embargo, en este estudio preliminar retrospectivo los investigadores no pudieron identificar cuantos de los pacientes que evolucionaron hacia rinitis alérgica tenían un cuadro de RAL en el momento del primer diagnóstico 4-7 años antes. Hacen falta más estudios para poder explorar en profundidad la evolución natural de la RAL que permitan identificar posibles factores pronósticos que mejoren el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes. En este sentido, Rondón y col. han publicado en 2013 (Rondón, 2013) los resultados preliminares de los primeros 5 años de un estudio prospectivo a 10 años de seguimiento en el que se ha analizado la

evolución de 194 pacientes con RAL confirmada mediante TPN positivo con al menos un aeroalérgeno (DP, *Alternaria*, olivo o mezcla de gramíneas) y 130 sujetos control sin rinitis. Todos los sujetos fueron revisados anualmente mediante cuestionario demográfico y clínico, espirometría, prueba cutánea mediante prick test y determinación de IgE sérica específica. La mayoría de los pacientes con RAL eran mujeres no fumadoras, con clínica de rinitis perenne persistente moderada-grave, con historia familiar de atopia y residentes en ambiente urbano. Una evaluación inicial de los pacientes mostró que la conjuntivitis (51%) y el asma (18,8%) eran las comorbilidades asociadas más frecuentes y DP el principal aeroalérgeno detectado en el TPN (51%), seguido de *Alternaria* (35,2%). Tras 5 años de seguimiento, se detectó que el porcentaje de pacientes con polisensibilización había aumentado del 36,4% al 40,9%, aunque la sensibilización a un solo alérgeno fue el perfil más frecuente al inicio del estudio (63,6%). Así mismo, se observó un empeoramiento de la rinitis en el 26% de los pacientes, con incremento en la persistencia y la severidad de los síntomas nasales, con aumento de la aparición de conjuntivitis (7,9%) y asma (5,6%) como principales comorbilidades asociadas. Se evaluaron datos de atopia sistémica tanto en sujetos con RAL como en controles encontrándose una aparición similar de nuevas positividads en prick y/o IgE específica en suero para alérgenos en ambos grupos (LAR: 12/176,6.8%;sujetos control: 6/115,5.2%,  $p>0.05$ ). DP fue el principal alérgeno causante de sensibilización (5,1%), seguido por el polen de gramíneas (4%).Estos resultados, pendientes de concluir el estudio a los 10 años de seguimiento, muestran que una proporción tanto de pacientes con RAL como sujetos control han desarrollado atopia sistémica sin diferencias significativas entre grupos, sugiriendo que la RAL y la RA clásica pueden ser dos entidades bien definidas.

Estos resultados han llevado a los investigadores a preguntarse si podría existir producción local de IgE específica en otras enfermedades respiratorias aparentemente no alérgicas como el asma, la rinosinusitis crónica o la conjuntivitis. Así, aunque hace años Rackeman acuñó el término "extrínseca" e "intrínseca" para describir la

presencia o ausencia de atopía en pacientes con asma (Rackemann FM,1947), posteriormente estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto notables similitudes en la inmunopatología celular y molecular del asma atópica y el asma no atópica, planteando la posibilidad de un papel para el anticuerpo IgE en ambos fenotipos clínicos de la enfermedad (Humbert M,1999; Jayaratnam A, 2005; Kroegel C,1997; Romanet-Manent S,2002). En este sentido, existe una amplia evidencia de la síntesis local de IgE específica , con expresión de transcriptores de la línea germinal épsilon y RNA-m para la cadena pesada de IgE en células B de la mucosa bronquial en el asma atópica y no atópica (Ying S,2000), cambio activo de isotipo hacia IgE (Taknar P,2007) y alta expresión de receptores de alta afinidad para IgE en las células de muestras de biopsia bronquial de pacientes con asma atópica y no atópica (Humbert M,1996). Estas consideraciones sugieren que la IgE puede ser importante en el asma considerado no atópico y que ésta puede generarse en la mucosa bronquial, tal y como ocurre en la mucosa nasal de pacientes con RAL. Recientemente, Mouthuy y col. demostraron la producción local de IgE en pacientes con asma no atópica y la capacidad de esta IgE para reconocer antígenos para DP (Mouthuy J,2011). Sin embargo, los autores no pudieron demostrar una respuesta clínica a la exposición de este alérgeno en estos mismos pacientes.

El asma está presente en el 30% de los sujetos con RAL (Rondón, 2012). Sin embargo, el posible papel de los alérgenos en los síntomas bronquiales que presentan los sujetos con RAL no está bien conocido. Campo y col. (Campo P,2011) han observado respuestas bronquiales positivas a DP mediante test de provocación bronquial (TPB) en 8/16 pacientes con RAL confirmada. El análisis de esputo inducido después del TPB reveló aumentos similares de los eosinófilos y ECP en los pacientes con RAL y controles, aumentando la evidencia de un posible equivalente de RAL en las vías respiratorias inferiores.

La continuación de estos estudios y otros proporcionarán en el futuro nuevas evidencias de la producción local de IgE a nivel bronquial y el papel de ésta en la fisiopatología de la enfermedad.

## 5.2 Factores de riesgo de la rinitis alérgica sistémica y local

### ➤ **Genética y antecedentes familiares**

El factor de riesgo más claro de rinitis alérgica son los antecedentes familiares de alergia, especialmente el de rinitis alérgica (Bousquet J, 2001). Durante la última década, se han identificado varios antígenos del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA del inglés "*human leukocyte antigen*") que aparecen asociados con una mayor frecuencia en pacientes con rinitis alérgica estacional (Barnes K, 1998). Se han propuesto genes candidatos involucrados en la respuesta inmune específica (sistema HLA y receptor de células T, TCR, del inglés *T-cell receptor*) (Marsh DG, 1982; Blumenthal M, 1992; Huang SK, 1995), en la respuesta IgE total (IL-4, IL-4R, IFN $\gamma$ , Fc $\epsilon$ RIB) (Sandford AJ, 1993; Marsh DG, 1994) así como en el cromosoma 12q para el asma y la rinitis alérgica (Barnes KC, 1999).

### ➤ **Factores de riesgo al comienzo de la vida**

Varios estudios han mostrado evidencias de que la sensibilización a los alérgenos podría ocurrir en una etapa muy temprana de la vida (Strachan DR, 1994). Sin embargo, los estudios epidemiológicos muestran resultados contradictorios.

Según un estudio realizado en un grupo de reclutas de Suecia (Braback L, 1998), la juventud de la madre, la gestación múltiple, la prematuridad, el bajo peso al nacer, el retraso en el crecimiento y el distrés respiratorio perinatal se relacionan significativamente con una reducción del riesgo de padecer rinitis alérgica. Sin embargo, los resultados de otro estudio (Wright AL, 1994), reflejan una asociación entre la introducción temprana de comidas sólidas, el hábito fumador de la madre durante el primer año de vida y los niveles elevados de IgE con el desarrollo de rinitis en los primeros años de vida.

La edad materna durante la gestación, el peso al nacer, la edad gestacional y/o la exposición intrauterina al tabaco no se ha podido relacionar con la aparición de rinitis alérgica estacional (Sibbald B, 1995). Sin embargo en otros dos estudios con cohortes de recién nacidos ingleses hubo una tendencia al aumento de la prevalencia de rinitis alérgica al descender el orden de nacimiento, aumentar la edad materna, la exposición intrauterina al humo del tabaco y el aumento de duración de la lactancia (Butland BK, 1997).

Varios estudios han encontrado una relación inversa entre atopía, rinitis alérgica estacional y asma con el número de hermanos y el orden de nacimiento (Strachan DP, 1989; Svanes C, 1999; Butland BK, 1997). El efecto protector del número de hermanos sobre el asma y la rinitis se ha intentado explicar por un desequilibrio de los linfocitos CD4 a favor de los Th1 debido a la mayor frecuencia de infecciones respiratorias (Holt PG, 1997). Sin embargo no se ha encontrado concordancia con otras variables como la edad de entrada a la guardería donde las infecciones son muy frecuentes (Ponsonby AL, 1999; Kramer U 1999).

#### ➤ **Grupos étnicos**

Se han realizado pocos estudios sobre la prevalencia de la rinitis alérgica en diferentes grupos étnicos. En un estudio realizado en Inglaterra se observó que los sujetos nativos tuvieron menos riesgo de sufrir alergia que los habitantes nacidos en Asia o en las Indias Occidentales (Gillam SJ, 1989). En España, una encuesta epidemiológica demostró una mayor prevalencia de atopía en la población de etnia gitana de la ciudad de Vitoria, sin embargo, no se encontró ninguna relación con las condiciones de las viviendas ni se halló ningún determinante genético en los polimorfismos estudiados (García M, 1995).

#### ➤ **Exposición a alérgenos**

La exposición precoz a alérgenos son conocidos factores de riesgo para el desarrollo de la rinitis alérgica (Boulet LP, 1997). Recientemente han surgido nuevas hipótesis sobre el efecto de la exposición alérgica. Por ello, se ha sugerido el efecto protector de la

exposición precoz a plumas de almohadas o edredones, gatos y perros en algunos individuos (Frosh AC, 1999; Hesselmar B, 1999; Platts-Mills JA, 2005).

#### ➤ ***Diferencias rurales y urbanas y modificación del estilo de vida***

Diferentes estudios han demostrado que la prevalencia de atopia (definida como la positividad de tests cutáneos frente a aeroalérgenos habituales en el medio) y de rinitis alérgica es mayor en áreas urbanas que en áreas rurales (Charpin D, 1996; Gergen PJ, 1992; von-Mutius E, 1994). La polución, especialmente los residuos de combustión diésel, aumentan el potencial alergénico de los pólenes (Behrendt H, 1997; Molfino NA, 1992). Recientemente se ha evidenciado que los hijos de granjeros tienen menos rinitis alérgica que los otros niños, sugiriendo que el estilo de vida de las áreas rurales podría proteger a los niños frente al desarrollo de enfermedades alérgicas (Braun-Fahriander C, 1999).

#### ➤ ***Tabaquismo***

Estudios transversales indican que los adolescentes con rinitis alérgica fuman más que los no alérgicos (Weiland SK, 1994). Sin embargo, en otros trabajos se ha observado que los fumadores padecían menos rinitis alérgica estacional que los no fumadores (Annesi-Maesano I, 1997). Desafortunadamente, la ausencia de estudios longitudinales hace difícil poder establecer con certeza si el tabaquismo es un factor predisponente de alergia (Jarvis D, 1995; Jarvis D, 1999).

#### **-Factores predisponentes de la RAL**

Siendo la RAL una entidad clínica de reciente definición, existen poca información acerca de los factores de riesgo relacionados con su desarrollo. Existen datos (Rondón, 2012) (Tabla 4) que reflejan que los pacientes con RAL son capaces de identificar factores desencadenantes con más frecuencia que el grupo de pacientes con RNA. En este trabajo, el polvo doméstico fue el principal factor desencadenante comunicado en el grupo RAL (47.3%) (también en el grupo de RA, 38.1%), siendo los olores irritantes el más frecuente en el grupo de RNA (45.8%). La exposición a polen fue el segundo factor de riesgo identificado por orden de frecuencia tanto en el grupo

RAL (22.7%) y RA (23.7%) sin existir diferencia estadísticamente significativa entre grupos. El segundo factor de riesgo en frecuencia para el grupo RNA fue la exposición al aire acondicionado (29.2%). En este estudio también se evaluaron otros posibles factores desencadenantes como la exposición a epitelio de animales, humedad y cambios de temperatura, sin encontrar diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Un dato llamativo observado fue que el 81% de los pacientes RAL eran no fumadores, siendo este grupo el que curiosamente presentó un valor medio más bajo del FEV1% ( $91.3 \pm 8.6$ ), existiendo diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo RA ( $FEV1\% = 98.1 \pm 10.2$ ,  $p=0.025$ ). En cuanto a la edad, se obtuvo diferencia significativa entre RAL y RNA siendo la mayoría de los pacientes RAL menores de 30 años ( $29.5$  años  $\pm 12.47$ ;  $41.83$  años  $\pm 15.19$  en el grupo RNA,  $P=0.001$ ). Las mujeres fueron las más afectadas (78.2%) siendo esta diferencia significativa con respecto al grupo RA ( $p=0.001$ ). Todos los pacientes vivían en ambiente urbano y la mayoría contaban antecedentes familiares de atopia. Estos datos discrepan de otros estudios epidemiológicos realizados anteriormente (Leynaert B, 1999 ;Molgaard E, 2007), donde al evaluar diferencias entre sujetos RAL y RNA se observó que un número considerable del grupo RNA eran mujeres jóvenes, mientras que en el de Rondón y col. (Rondón, 2012) eran mujeres con una media de edad  $>40$  años.

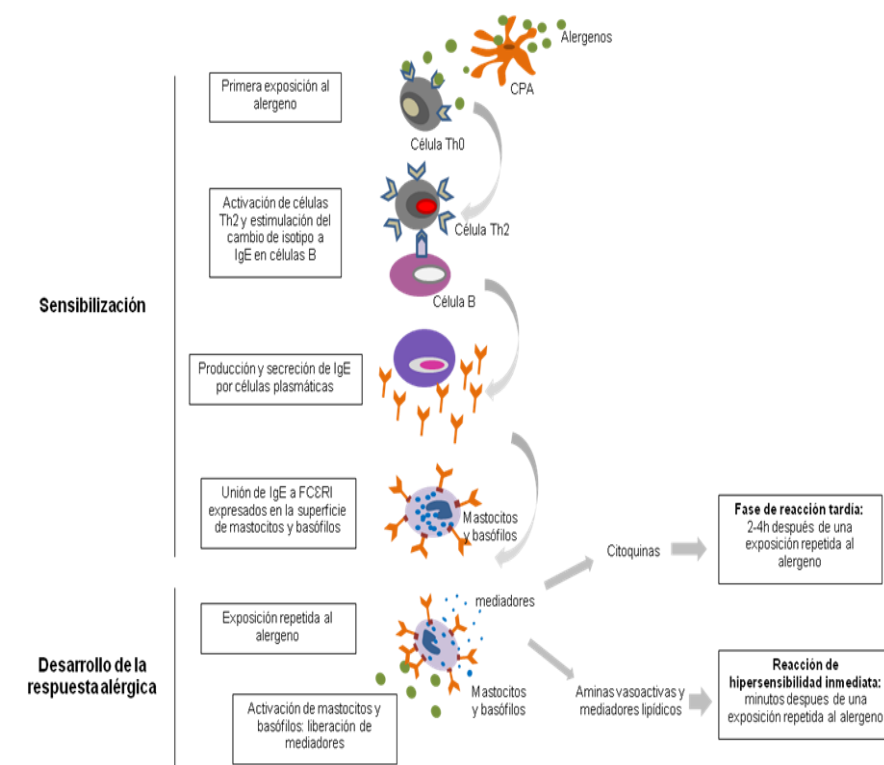
	RAL (n= 110)	RNA (n=48)
Edad de inicio	21	36
Presentación en la infancia	36%	9%
Género	78% mujeres	52% mujeres
AF de atopia	44%	21%
Rinitis	Persistente perenne	Persistente perenne
Síntomas más comunes	Prurito, rinorrea acuosa	Obstrucción, rinorrea mucosa
Síntomas más graves	Rinorrea acuosa	Bloqueo nasal
Asma	31%	18%
Conjuntivitis	64%	50%

**Tabla 4:** Datos demográficos y clínicos en pacientes con RAL y RNA. Tomado de Rondón y col., Allergy 2012.

### 5.3 Etiopatogenia y fisiopatología de la rinitis alérgica sistémica y local

#### 5.3.1 Reacción alérgica IgE mediada en la rinitis alérgica

La rinitis alérgica es una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal mediada por anticuerpos IgE que se desencadena tras la exposición a un alérgeno específico (Bousquet J, 2001). Para que se produzca una respuesta IgE, es necesario un alérgeno e IgE específica en un individuo previamente sensibilizado, desencadenándose una reacción de hipersensibilidad tipo I con la consiguiente liberación de mediadores pro-inflamatorios, dando lugar a la aparición de síntomas a los pocos minutos de la estimulación del mastocito o el basófilo por el alérgeno. Esta fase puede estar seguida de una reacción de fase tardía, que aparece entre las seis y nueve horas siguientes a la exposición al alérgeno, y se caracteriza por un infiltrado inflamatorio de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos inducido por mediadores liberados por mastocitos y basófilos (Figura 7).



**Figura 7:** Secuencia de acontecimientos de las reacciones alérgicas inmediatas: fase de sensibilización y desarrollo de la respuesta alérgica inmediata. Tomada de Abbas AK *et al.*, 2012.



Para que tengan lugar estas reacciones de hipersensibilidad debe existir una exposición previa al alérgeno que se denomina fase de sensibilización. Éste es procesado y presentado por una célula presentadora de antígeno al linfocito T, activándolo y favoreciendo su diferenciación hacia linfocito Th2, que sintetiza IL-4 e IL-13 que junto con otras señales y moléculas coestimuladoras intervienen en la diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática secretora de IgE específica del alérgeno. La IgE específica se une a sus receptores de alta afinidad presentes en mastocitos y basófilos. Posteriormente, y ante una reexposición al alérgeno, se produce la interacción de éste con dos o más moléculas de IgE específica fijadas a mastocitos y/o basófilos, provocando el entrecruzamiento de los receptores adyacentes y desencadenando una cascada de señales que conduce a la activación celular y liberación por degranulación de mediadores preformados como la histamina y la síntesis de *novο* de otros como prostaglandinas y leucotrienos, responsables de los síntomas de la reacción alérgica (Abbas AK, 2012; Howarth PH, 2003; Ishizaka T, 1978; Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).

### **5.3.2. Fases de la respuesta alérgica nasal en la rinitis alérgica**

Los estudios de provocación nasal con alérgenos (Carrney, 2002; López S, 2010; Rondón C, 2007; Rondón C, 2008; Rondón C, 2009; Wedbäck A, 2005) nos han permitido mejorar nuestros conocimientos sobre los mecanismos inmunológicos implicados en la rinitis alérgica, detectándose una respuesta alérgica nasal en fase precoz y en fase tardía.

- **Fase precoz**

Se inicia a los pocos minutos de la exposición al alérgeno, alcanzando su pico máximo a los 10-15 minutos, y desaparece progresivamente en unos 60 minutos. Los pacientes presentan prurito nasal, rinorrea, estornudos y ocasionalmente obstrucción nasal. Durante esta fase se produce (Figura 8):

- Liberación de mediadores vasoactivos: La activación del mastocito produce la liberación de mediadores que incluyen histamina, triptasa, prostaglandina (PG) D2, leucotrienos (LT) B4 y C4. Existe una gran heterogeneidad en la liberación de

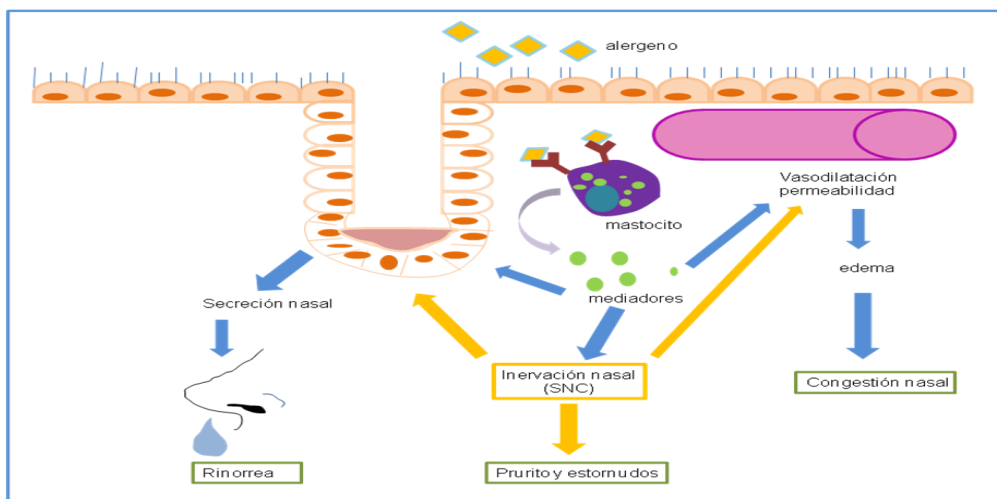
mediadores y/o en la sintomatología inducida, lo que sugiere que los mediadores liberados y la respuesta a estos varían de unos individuos a otros. Sin embargo, la histamina siempre se correlaciona con la aparición de estornudos y rinorrea, alcanzando su pico máximo en los primeros 2 minutos, de forma paralela a su liberación (Baroody FM, 1994). Los cys-LT y la PGD2 producen un aumento de la permeabilidad vascular y de la secreción glandular mediante estimulación de fibras nerviosas parasimpáticas. Su liberación parece ser más prolongada, induciendo obstrucción nasal (Lebel B, 1988; Naclerio RM, 1983).

- Exudación plasmática: Durante la fase precoz de la respuesta alérgica se produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular que ocasiona hipersecreción y congestión nasal (Holmberg K, 1988). El exudado plasmático contiene quininas, mediadores vasculares, albúmina, inmunoglobulinas, histamina, mediadores pro-inflamatorios y proteínas activadas del complemento.

- Activación de células epiteliales: Las células epiteliales son activadas rápidamente tras la provocación con alérgenos, demostrado por un aumento de la expresión de moléculas de adhesión (Canonica GW, 1994).

- Neuropéptidos: La histamina induce la activación de las terminaciones nerviosas de las uniones epiteliales produciendo prurito nasal y estornudos. La secreción glandular se estimula directamente por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y colinérgicos (Mullol J, 1992).

- Secreción de factores quimiotácticos: Durante la fase precoz, los mastocitos y células epiteliales liberan factores quimiotácticos (citoquinas y mediadores como el LT B4) y factor activador plaquetario (PAF, del inglés *platelet activating factor*) que desencadenan una cascada inflamatoria (Christodouloupoulos P, 2000; Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).



**Figura 8.** Fase precoz de la respuesta alérgica nasal. Tomado de Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004.

#### ▪ **Fase tardía:**

Se inicia a las 3-6 horas de la exposición al alérgeno, alcanzando su pico máximo a las 6-8 horas, y remitiendo en las 12-24 horas siguientes a la provocación. Los pacientes manifiestan fundamentalmente obstrucción nasal, y en menor medida rinorrea y estornudos. Se han observado respuestas duales (fase precoz y tardía) en el 40-50% de los pacientes (Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).

La fase tardía se caracteriza por (figura9):

- Activación celular y secreción de mediadores pro-inflamatorios: Durante esta fase se produce un reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en la mucosa nasal debido a la acción de citoquinas y quimioquinas liberadas durante la fase precoz fundamentalmente por mastocitos y basófilos. Entre las células reclutadas encontramos: eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados que expresan CD25+ (receptor de IL-2), basófilos y neutrófilos.

Los eosinófilos son células efectoras que liberan ECP y MBP, además de otros mediadores como el LTC<sub>4</sub>, que produce una obstrucción nasal más potente que la histamina. Las ECP y MBP presentes en la mucosa y en las secreciones nasales de los pacientes con rinitis alérgica inducen la degranulación de otras células inflamatorias y lesionan a las células epiteliales (Klementsson H, 1992).

El número de basófilos se encuentra elevado en el lavado nasal obtenido 24 horas después del contacto con el alérgeno. De forma similar al mastocito, el basófilo interactúa con el alérgeno mediante el complejo IgE/FcεRI, se activa y libera histamina. Debido a que el nivel de histamina se encuentra elevado durante la fase tardía de la respuesta alérgica, pero no el de triptasa ni PGD<sub>2</sub>, se considera que esta liberación de mediadores se debe fundamentalmente a una activación del basófilo y no a una activación secundaria del mastocito (Iliopoulos O, 1992).

El papel de los neutrófilos en la fase tardía queda aún por clarificar. Se encuentran aumentados en el lavado nasal realizado a las 3-8 horas de la provocación nasal con alérgeno, pero se ha demostrado la presencia de estas células en pacientes con y sin fase tardía (Iliopoulos O, 1990).

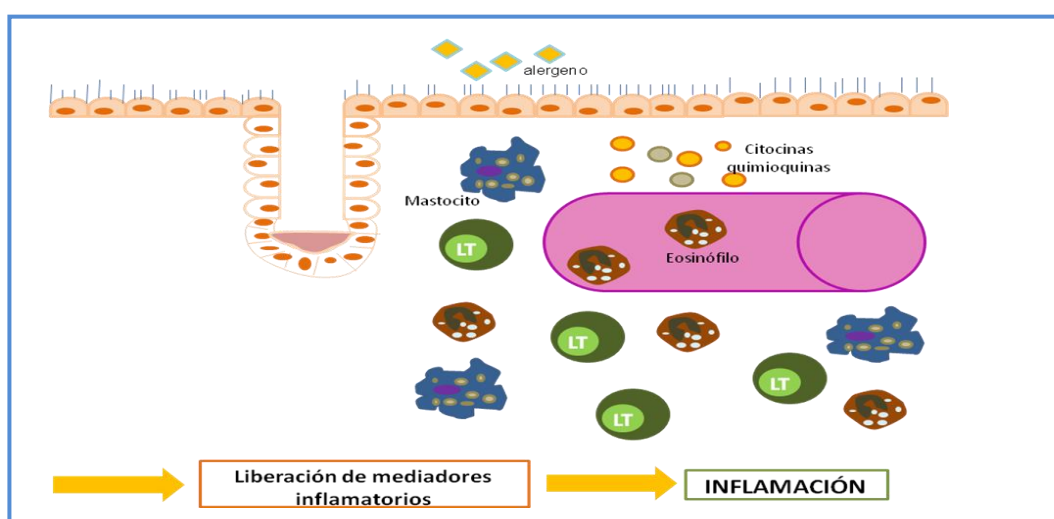
Entre los mediadores detectados en el lavado nasal de pacientes con rinitis alérgica encontramos: histamina, CysLT, proteínas derivadas de los eosinófilos (ECP, MBP) y quininas. La ECP se puede medir en la mayoría de los fluidos biológicos como un marcador de actividad y de recambio del eosinófilo; su medición en las secreciones nasales ha demostrado ser un método útil para la monitorización y la valoración de la inflamación nasal en pacientes con rinitis alérgica (Marcucci F, 2001; Wang D, 1995). Se pensó que la PGD<sub>2</sub> no era liberada durante la fase tardía, pero estudios recientes han demostrado que en al menos algunos pacientes hay una liberación significativa de este mediador (Christodouloupoulos P, 2000; Fokkens WJ, 1991; Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).

- Actuación de citoquinas y quimioquinas: Suelen estar implicadas en el reclutamiento, activación y perpetuación del infiltrado inflamatorio. Durante la fase tardía se liberan sustancias quimiotácticas del eosinófilo (IL-5, GM-CSF, eotaxina), RANTES (quimioquina C-C, que promueve la quimiotaxis de células T memoria) y de neutrófilos (IL-8). Existe una estrecha relación entre la expresión de ARNm de citoquinas tipo Th2 y el número de eosinófilos activados, lo que sugiere que el reclutamiento y activación de células CD4<sup>+</sup> y la liberación de citoquinas Th2 contribuyen al desarrollo de la

respuesta nasal tardía y se asocian a eosinofilia tisular. Esto demuestra la importancia e interdependencia del linfocito y el eosinófilo en las respuestas nasales tardías.

- Reclutamiento de células inflamatorias y moléculas de adhesión: La acumulación de células inflamatorias en la mucosa nasal es característica de la fase tardía. La eosinofilia tisular implica el reclutamiento de eosinófilos maduros y la proliferación de sus progenitores. Un factor clave es el aumento de expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales que favorece el paso de células sanguíneas a través del endotelio vascular hacia la mucosa nasal (Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).

- Supervivencia de las células inflamatorias: La supervivencia de las células inflamatorias en la zona de reacción alérgica depende de los fenómenos de muerte celular que se produzcan durante la evolución de la inflamación en la vías respiratorias o por apoptosis (muerte celular programada) destinada a la eliminación de células dañadas o superfluas (Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004).



**Figura 9:** Fase tardía de la respuesta alérgica nasal. Tomado de Sánchez-Guerrero Villanos I, 2004.

#### ▪ ***El efecto “Priming”***

La provocación nasal con pólenes difiere del curso de la enfermedad durante la exposición natural al alérgeno en la estación polínica. Los pacientes se encuentran expuestos durante días o semanas a los alérgenos, lo que produce una inflamación significativa de la mucosa nasal y una hiperreactividad nasal inespecífica. Además,

durante la provocación nasal con pólenes, el número de granos necesarios para inducir síntomas es mayor que los inhalados durante la exposición natural en la estación polínica (Lebel B, 1988; Naclerio RM, 1983). En 1969, Connell (Connell JT, 1969) observó que al realizar provocaciones nasales seriadas, el número de granos de pólenes necesarios para obtener una respuesta positiva era menor cuando se realizaba una segunda provocación al día siguiente. Esto lo denominó efecto "*priming*". Este efecto, sin embargo, desaparecía cuando los pacientes eran provocados en intervalos semanales. Todo esto es debido al influjo de eosinófilos y células metacromáticas atraídas a la mucosa por la primera provocación (Wachs M, 1989), que permanecen en la zona inflamada durante semanas. El efecto *priming* puede ser reproducido usando provocaciones con dosis muy pequeñas y repetidas del alérgeno. Además, los cambios en la liberación de los mediadores eosinofílicos del lavado nasal pueden ser observados a pesar de tener síntomas mínimos o inexistentes (Roquat A, 1996).

En un estudio en el que se detectaba cambios en el flujo de la microvascularización de la mucosa nasal mediante fluometría por *Doppler* utilizando láser, se observó que los pacientes que reaccionaban positivamente a provocaciones con pólenes mostraban un aumento en el flujo sanguíneo. Este aumento fue mayor tras la estación polínica que antes de ésta, a pesar de utilizar las mismas dosis de polen, indicando un fenómeno *priming* de los vasos sanguíneos (Juliussen S, 1988).

La descripción del efecto *priming* o efecto cebado conduce al desarrollo de otro concepto, el de "mínima inflamación persistente", que fue propuesto hace unos años por Ciprandi (Ciprandi G, 1995). Se ha confirmado tanto en rinitis alérgica perenne (Ciprandi G, 1995; Knani J, 1992) como en rinitis alérgica estacional (Bachert C, 1999; Ricca V, 2000) la persistencia del proceso inflamatorio en ausencia o disminución de la exposición al alérgeno. Durante la exposición natural al alérgeno se produce un aumento en la liberación de IL-1 en las secreciones nasales (Bachert C, 1995; Bachert C, 1999; Linden M, 1995), que puede persistir durante varias semanas tras la finalización de la estación

polínica (Bachert C, 1999) lo que sugiere la existencia de un proceso inflamatorio persistente que continúa una vez finalizada la exposición al alérgeno.

- **Papel del basófilo en la RAS y RAL**

Como se ha descrito previamente, la activación de mastocitos y basófilos provoca cambios en sus membranas celulares y desencadena una serie de reacciones enzimáticas en cascada que finaliza con la secreción de un gran número de mediadores preformados almacenados en sus gránulos así como de otros mediadores sintetizados de novo. Todas estas sustancias liberadas van a ser las responsables de las manifestaciones clínicas características de la rinitis alérgica (estornudos en salvas, prurito, rinorrea, bloqueo nasal) y van a contribuir a la inflamación alérgica. Así, durante la fase tardía de la respuesta alérgica nasal se produce un reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en la mucosa nasal debido a la acción de las citoquinas y quimiocinas liberadas durante la fase precoz. Entre ellas encontramos además de basófilos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos y neutrófilos. Además, debido a que durante la fase tardía de la respuesta alérgica el nivel de histamina se encuentra elevado, pero no el de triptasa ni PG D<sub>2</sub>, se considera que esta liberación de mediadores se debe a una activación del basófilo y no a una secundaria activación del mastocito (Iliopoulos O, 1992). Por tanto, dentro de las células implicadas, los basófilos de sangre periférica así como los mastocitos a nivel tisular son células clave en la respuesta alérgica siendo las células efectoras primarias de las reacciones inmediatas mediadas por IgE (Schroeder JT, 2009).

Los basófilos en condiciones normales no se encuentran en los tejidos, emigrando a éstos cuando se produce una reacción inflamatoria (Pawankar R, 1997; Schroeder JT, 1997). Así, estas células son escasas en la mucosa nasal pero, en los sujetos con rinitis alérgica, infiltran la mucosa tras la exposición al alérgeno. Pueden detectarse en el epitelio y en la lámina propia a los 60 minutos, en el lavado nasal 24 horas tras la provocación nasal con alérgeno y pueden persistir hasta una semana (KleinJan A, 2000).

La presencia de basófilos en la mucosa nasal tras el contacto con el alérgeno ha podido demostrarse no solo en pacientes con RAS. Existen estudios (Rondón, 2007; Rondón, 2008) donde mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales marcados, se ha podido objetivar la presencia de basófilos en muestras de lavado nasal de pacientes con RAL persistente por ácaros durante la exposición natural al alérgeno en niveles similares a los de pacientes con RAS y significativamente más elevados que sujetos control. Así mismo, se ha visto que el número de basófilos en lavado nasal aumenta tras la exposición natural a pólenes en pacientes con RAL estacional y en pacientes con RAS persistente por pólenes comparado con sujetos control sin rinitis (Rondón, 2008).

### **5.3.3 Etiopatogenia y fisiopatología de la RAL**

Hasta hace no muchos años, la rinitis idiopática era un término que designaba a un grupo de rinitis cuya fisiopatología y etiopatogenia eran poco conocidas, que carecía de métodos diagnósticos propios y cuya filiación se realizaba fundamentalmente por exclusión (Bousquet J, 2001; Brozek JL, 2008; van Rijswijk JB, 2005).

Han existido a lo largo de los años varias teorías sobre la etiopatogenia de la rinitis idiopática, como son la existencia de un proceso inflamatorio crónico, mecanismos neurogénicos y alteraciones en la permeabilidad vascular sin que por el momento se pueda concretar cuál de ellos sería el predominante o el que afecta al mayor número de pacientes (Bousquet J, 2001). Uno de los mecanismos fisiopatológicos propuestos es la existencia de un proceso inflamatorio crónico como respuesta a alérgenos no identificados, en cuya etiología se ha considerado entre otros posibles mecanismos la existencia de una forma localizada de alergia en ausencia de atopia sistémica (Carney AS, 1996; Powe DG, 2001; Powe DG, 2003; Rondón C, 2007; Rondón C, 2008; Shatkin JS, 1994).

Fueron Huggins y Brostoff los que en 1975 sospecharon la síntesis local de IgE en un grupo de pacientes con clínica de rinitis pero con prick test e IgE específica en suero negativas para polen de gramíneas (Huggins y Brostoff, 1975). En su estudio, la sensibilización a polen de gramíneas fue confirmada mediante provocación nasal con



extracto de polen de gramíneas y la detección de IgE específica en secreciones nasales. Sin embargo, no pudieron establecer si la detección de IgE en la secreción nasal era resultado de una exudación de IgE desde el plasma, del reclutamiento de células que transportan IgE en sus receptores de superficie, de la migración de células plasmáticas productoras de IgE o de la producción *in situ* de inmunoglobulina E por las células B de la mucosa nasal. La última de las posibilidades fue examinada años más tarde por Bachert y Ganzer (Bachert, 1988), quienes mediante técnicas de inmunohistoquímica pudieron detectar un pequeño número de células B IgE+ en glándulas cervicales y tejido amigdalario pero no en la mucosa nasal de pacientes con “fiebre del heno”.

Posteriormente Blom y col. (Blom HM, 1995) detectaron mastocitos, eosinófilos y células IgE+ en la mucosa nasal de pacientes con rinitis vasomotora comparado con un grupo de sujetos sanos, aunque sin encontrar diferencias significativas en el número de células entre los dos grupos.

Es en el año 1997 cuando el equipo de investigadores encabezado por Durham (Durham, 1997) demuestran la expresión de transcritos de la línea germinal  $\epsilon$  y RNA-m para la cadena pesada de IgE en células B nasales (CD 20+) mediante técnicas de hibridación *in situ* en muestras de biopsia de mucosa nasal tras provocación nasal con polen de gramíneas en pacientes con rinitis alérgica por gramíneas comparado con un grupo control de sujetos sanos. Resultados similares que recientemente ha publicado el grupo de Kennedy y col. (J.Kennedy,2011) demostrando que el cambio activo de isotipo hacia IgE tenía lugar en la mucosa nasal, con la detección de producción activa de transcritos de la línea germinal  $\epsilon$  en 10/10 pacientes con RNA.

Posteriormente han sido varios los estudios inmunológicos que confirman la existencia de una respuesta nasal inflamatoria Th2 mediada por anticuerpos IgE en la RAL. Powe y col, utilizando piezas de turbinectomía detectaron, a diferencia de los primeros hallazgos en este sentido encontrados por Blom y col., mayor cantidad de mastocitos,

eosinófilos y células IgE+ en pacientes con RI y con rinitis alérgica que en controles sanos (Powe DG, 2001). Dos años más tarde, estos mismos autores publicaron un estudio inmunohistoquímico en el que detectaron unión de IgE específica a polen de gramíneas en muestras de mucosa nasal de turbinectomía en una serie corta de 3/10 pacientes con RI (Powe DG, 2003). Y un año después, empleando la misma tecnología, demostraron niveles más elevados de células T CD8+ que CD4+ en pacientes con RI que en controles sanos, y un menor número de células presentadoras de antígenos en la mucosa nasal de pacientes con RI en comparación con RA. Sin embargo, no realizaron provocación nasal con alérgeno ni determinación de IgE específica nasal, por lo que no pudieron llevar a cabo estudios comparativos del fenotipo de células T entre pacientes con RNA y RAL (Powe DG, 2004).

Varios investigadores han detectado la existencia de una respuesta positiva al test de provocación nasal (TPN) con aeroalérgenos en el 47% al 63% de los pacientes diagnosticados de RI (Carney AS, 2002; Rondón C, 2007; Rondón C, 2008; Wedbäck A, 2005). En 2002, Carney y col. (Carney AS, 2002) detectaron respuesta positiva al TPN (principalmente a ácaros del polvo) en el 62% de un grupo de 21 pacientes con RI. La respuesta fue monitorizada mediante rinomanometría anterior activa y puntuación de síntomas. En 2005, Wedbäck y col. (Wedbäck A, 2005) encontraron un 47% de respuestas positivas al TPN con abedul en 13 pacientes con RI estacional. Más tarde, el grupo de Rondón y colaboradores (Rondón C, 2007) realizaron un estudio comparativo durante el periodo sintomático de la enfermedad (exposición natural al alérgeno) y tras aplicación de TPN con el ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), alérgeno responsable de la mayoría de los casos de rinitis alérgica persistente en su ámbito de estudio, en una muestra de 80 pacientes con rinitis perenne (50 RI y 30 RA) y 30 controles sanos. Se detectó una respuesta positiva al TPN con DP en el 54% de los pacientes con RI y presencia de IgE específica nasal en el 22% de ellos. Además, el estudio de las muestras de lavado nasal mediante citometría de flujo demostró que RA y RAL presentan un patrón leucocitario-linfocitario muy similar, con niveles

significativamente más elevados de eosinófilos, basófilos, mastocitos, células T CD3+ y CD3+CD4+, ECP y albúmina que los controles sanos. Más del 70% de los pacientes con RI y RAL presentaron criterios clínicos de NARES (eosinofilia nasal >20%). Estos resultados han sido reproducidos en un estudio posterior (Rondón, 2008), comparando 67 pacientes con rinitis estacional (32 RI y 35 RAS) con síntomas exclusivamente en los meses de primavera y controles sanos, obteniéndose una respuesta positiva al TPN a gramíneas, a olivo o a ambos en el 63% de los pacientes.

Posteriormente se han publicado dos estudios importantes sobre la cinética de producción nasal de IgE específica y de mediadores inflamatorios tras TPN en RAL estacional y perenne (López S, 2010; Rondón C, 2009). Concretamente, Rondón y col. publicaron el primer estudio sobre cinética de producción local de IgE específica, ECP y triptasa tras TPN con gramíneas en pacientes con RAL (Rondón C, 2009). Los resultados obtenidos confirman que la inhalación del alérgeno induce una activación *in situ* de mastocitos y eosinófilos más producción de IgE específica. La cinética de secreción nasal de triptasa presentó una fuerte correlación con los síntomas de prurito y estornudos, y un patrón de secreción diferente en respuestas inmediatas aisladas y respuestas duales. Las respuestas inmediatas presentaron niveles significativamente elevados de triptasa a los 15 minutos y a la hora después de la provocación, mientras que las respuestas duales mantuvieron niveles significativamente más elevados de triptasa desde los 15 minutos hasta las 6 horas tras la provocación. La cinética de secreción de IgE específica y de ECP no mostró un patrón diferente entre respuesta inmediata y dual. La secreción de ECP tuvo niveles significativamente elevados a los 15 minutos del TPN, con una curva ascendente de secreción durante todo el periodo de observación (15 minutos, 1h, 6h y 24h). La reproducibilidad de estos resultados quedó confirmada al año siguiente por el estudio de López y col. (López S, 2010) en un grupo de 40 pacientes con RAL perenne con respuesta positiva al TPN con DP.

Ambos estudios han demostrado la existencia de una rápida secreción de IgE específica tras la provocación nasal con alérgeno, que junto con la detección en

algunos pacientes de niveles basales de IgE específica nasal fuera de la época de exposición natural al alérgeno, apoya la existencia de una síntesis persistente de IgE específica en la mucosa nasal de pacientes con RAL que se ve rápidamente estimulada por el alérgeno en el test de provocación.

Resultados similares han sido obtenidos con otros alérgenos como los hongos (*Alternaria alternata*), demostrándose la producción local de IgE específica para *Alternaria* durante la exposición natural al alérgeno y una respuesta positiva al test de provocación nasal con dicho extracto fuera de la época de exposición ambiental a sus esporas (N. Fuiano, 2012) en pacientes con clínica de rinitis sin atopia sistémica. En este estudio, de la muestra de 56 pacientes con edades comprendidas entre los 4 y los 18 años, 36 de ellos (64,3%) tuvieron un prick test negativo y una determinación nasal de IgE específica positiva para *Alternaria*, de los que 30 (83,3%) presentó un TPN positivo para dicho extracto. Además, la positividad de la IgE específica nasal y el TPN se observó en 36 pacientes (69,6%) mientras que la positividad del prick test y el TPN se observó en 15 de ellos (26,8%), siendo esta diferencia observada estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Hasta la actualidad no existe un estudio similar realizado en población adulta con RAL, existiendo algunos trabajos en pacientes con poliposis nasal (Matsuwaki Y, 2013; Sheahan P, 2010; Wise SK, 2009).

En resumen, las principales características fisiopatológicas de la RAL incluyen la presencia de una respuesta positiva al test de provocación nasal específico con alérgenos (Carney, 2002; Rondón, 2007; Rondón, 2008; Wedbäck A, 2005), con una respuesta inflamatoria nasal tipo Th2 (Powe, 2001; Powe, 2003; Powe, 2004; Rondón, 2007; Rondón, 2008), producción local de IgE específica a alérgenos (Huggin y Brostoff, 1975; Rondón, 2007; Rondón, 2008) e incremento de mediadores inflamatorios (López, 2010; Rondón, 2009).

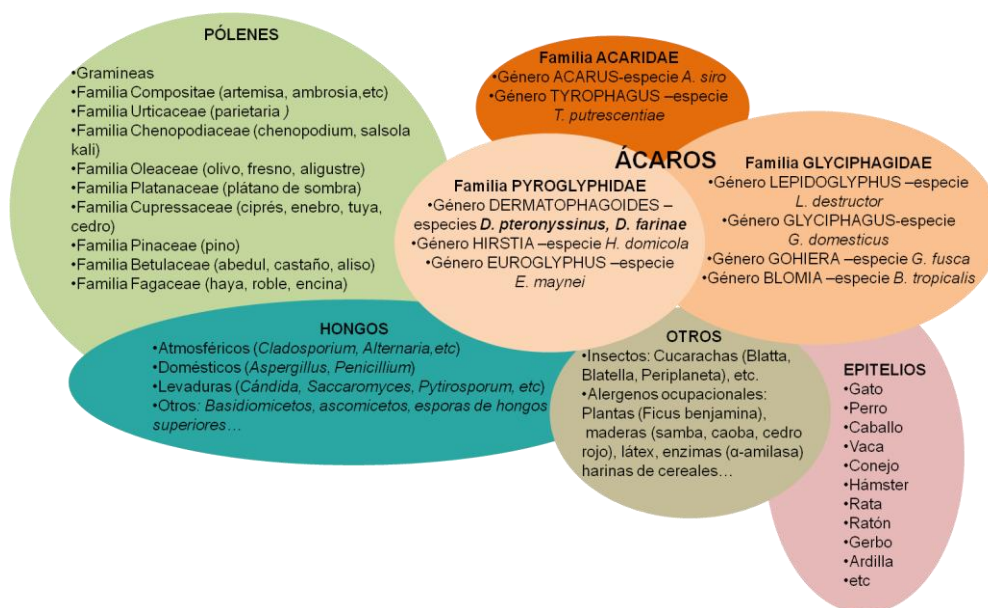
#### 5.3.4. Alérgenos

Se define un alérgeno como una proteína capaz de inducir una respuesta inmunológica que frecuentemente está mediada por anticuerpos IgE específicos. No se conoce bien cuáles son las características necesarias para que una proteína sea alergénica. Lo que se sabe es que las señales necesarias para que la respuesta inmunológica derive en una activación de linfocitos T colaboradores (helper) del tipo 2 (Th2) (Huby RD, 2000) se encuentran en el medio cuando se realiza la presentación del antígeno por parte de las células presentadoras al linfocito T virgen (Comoy EE, 1998).

La mayoría de las proteínas alergénicas desempeñan importantes funciones biológicas. Se trata de proteínas que pueden mostrar actividad enzimática, tanto reguladora como inhibitoria, y proteínas implicadas en el transporte (Stewart GA, 1996). Por ejemplo, las profilinas son proteínas reguladoras y el alérgeno mayor del polen de abedul (Bet v 1) y la mayoría de los alérgenos de los ácaros del polvo muestran actividad enzimática (Bufe A, 1996; Mahoney NM, 1997).

Los alérgenos inhalados o aeroalérgenos son aquellos a los que el sujeto se expone de forma natural por vía inhalatoria y generalmente son los responsables de la rinitis y del asma alérgico. Son, en general, proteínas pequeñas (10-60 Kda), cuya solubilidad en medios acuosos facilita su liberación desde las partículas inhaladas al llegar al sistema respiratorio. Estas partículas volátiles pueden ser de origen diverso (heces, polen, esporas) y su tamaño determina el tiempo de permanencia en el aire y, por lo tanto, el grado de exposición al alérgeno.

Los aeroalérgenos, pueden clasificarse, según su fuente de origen, en varios grupos: ácaros, pólenes, epitelios de animales, hongos, insectos y otros (Stewart GA, 2003) (Figura 10). La prevalencia de sensibilización a los diferentes aeroalérgenos varía en función del área geográfica. Así, en nuestro medio, los ácaros del polvo doméstico y los pólenes constituyen dos de las principales fuentes alergénicas, junto con los mohos y epitelios de animales, responsables de la rinitis alérgica.



**Figura 10:** Principales alérgenos implicados en la rinitis alérgica. Tomado de Bousquet J, 2001.

### ➤ Ácaros del polvo doméstico

Pertenecen al *phylum* artrópodo, a la clase arácnidos, a la subclase *Acari*. Se han descrito más de 40.000 especies de ácaros, aunque los más relevantes, desde el punto de vista alergológico, son los que se encuentran en el entorno doméstico, y pertenecen a la familia *Pyroglyphidae*, que incluyen los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus* (Spieksma FT, 1997). Los principales factores ambientales que influyen en la presencia de ácaros son la temperatura y la humedad relativa. Estas condiciones explican que el género *Dermatophagoides* sea el más prevalente en nuestro área, con la especie *pteronyssinus* la que se sitúa a la cabeza (Figura 11).



**Figura 11:** *Dermatophagoides pteronyssinus*. Tomado de Laboratorios LETI.

En los últimos años, con ayuda de las técnicas de biología molecular, se han identificado varios alérgenos de los ácaros y, en algunos casos, se han determinado sus funciones biológicas. Estas han permitido clasificarlos en 4 grupos: alérgenos con función enzimática (grupos 1,3,4,6,8,9,15,18 y 20), con función de unión a ligandos (grupos 2,13,14 y 17), con actividad sobre el citoesqueleto (grupos 10,11 y 16) o con actividad biológica desconocida (grupos 5,7y12). Así, de los alérgenos identificados de *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), algunos tienen función enzimática como Der p1 (cisteína proteasa), Der p3 (tripsina), Der p4 (amilasa), Der p6 (quinotripsina), Der p8 (glutación-S-transferasa), Der p9 (serina proteasa colagenolítica), Der p15 (quitinasa) y Der p20 (arginina quinasa), otros tienen función de unión a ligandos, como Der p2 (proteína transportadora de colesterol), Der p13 (proteína transportadora de ácidos grasos) y Der p14 (función similar a apolipoforina), Der p10 y Der p11 tienen actividad sobre el citoesqueleto (tropomiosina y paramiosina, respectivamente) y Der p5, Der p7, Der p18 y Der p21 no tienen una función biológica conocida. Más del 80% de los pacientes con alergia respiratoria por ácaros posee IgE específica para Der p1, considerándose el alérgeno mayoritario de dicha especie. Der p1 es una proteína de 25 kDa con función cisteín proteasa, mediante la cual, al igual que el resto de alérgenos con actividad enzimática, puede alterar el epitelio respiratorio y aumentar la permeabilidad de la mucosa, facilitando el acceso del alérgeno a las células presentadoras de antígeno.

Se ha demostrado que 100 ácaros ó 2 µg de alérgenos por gramo de polvo son suficientes para sensibilizar durante la infancia y con 500 ácaros o 10 µg de Der p1 por gramo de polvo, la sensibilización del paciente muestra un riesgo relativo de 5 de desarrollar asma (Lau S, 1989; Sporik R, 1990).

### ➤ **Pólenes**

El grano de polen es el gametofito masculino en el reino vegetal. Según su modo de transporte, podemos distinguir pólenes entomófilos y anemófilos. Los entomófilos son los transportados desde la flor masculina a la femenina por insectos, mientras que los



anemófilos son transportados por el aire. Éstos últimos son las más importantes para los pacientes alérgicos. Su tamaño (10-100µm) les permite depositarse en la mucosa nasal y conjuntival, liberando posteriormente proteínas alergénicas.

Los pólenes alergénicos más importantes en nuestro entorno son las familias de *Gramíneas*, *Compositae*, *Urticaceae*, *Chenopodiaceae* y árboles de las familias *Betulaceae*, *Oleaceae*, *Fagaceae*, *Platanaceae*, *Cupressaceae* y *Pinaceae* (Bousquet J, 2008). Concretamente, las características geográficas y climáticas del área mediterránea promueven el crecimiento de una vegetación típica con la presencia de varias especies alergénicas, tales como *Parietaria judaica* (*Urticaceae*), *Olea europaea* (*Oleaceae*), varios miembros de la familia *Cupressaceae*, junto con *Artemisia* y varias especies pertenecientes a la familia de las gramíneas.

El olivo (*Olea europea*) es un árbol longevo que ha sido cultivado por el hombre durante más de 5000 años para la explotación de su fruto, aceite y madera. Probablemente tiene sus orígenes en Asia Menor, desde donde se extendió por toda el área mediterránea.

La alergia al polen del olivo (*Olea europea*) es una enfermedad compleja, influida tanto por factores ambientales como genéticos (Aguerre, 2013; Cárdena B, 2007; Llanes E, 2009; Quiralte J, 2007), y representa una de las más importantes causas de alergia respiratoria en las costas mediterráneas así como en algunas áreas del norte de América (Barber D, 2008). La exposición al polen de olivo causa síntomas naso-conjuntivales, así como exacerbaciones del asma entre finales de abril y principios de junio (Figura 12).

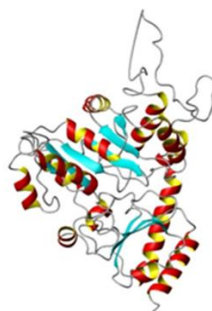
Dentro de sus alérgenos, Ole e 1 está considerado uno de los principales alérgenos del polen del olivo, con una frecuencia de unión a IgE de casi el 80% entre los pacientes con polinosis por dicho polen (Palomares Q, 2006; Rodríguez R, 2002). Es la proteína más abundante de los extractos de polen de olivo, constituyendo hasta el 20% del contenido total del extracto. Se ha purificado a partir del extracto del polen de olivo (Lombardero, 1992) y se ha determinado su secuencia completa de aminoácidos mediante la degradación de Edman de los péptidos resultantes de digestiones



proteolíticas (Villalba M, 1993). Así, se sabe que Ole e1 es una proteína polimórfica de 145 aminoácidos con una porción glicosilada (80-85% del alérgeno total) y no glicosilada con masas moleculares de 20 y 18,5 kD, respectivamente (Villalba M, 1993; Villalba M, 2014) (Figura 13).



**Figura 12:** Polen de olivo (imagen de M.E).



**Figura 13:** Ole e1. Tomado de Villalba M, 1993.

Además de Ole e1, otros once alérgenos del polen de olivo (de Ole e2 a Ole e12) han sido identificados y caracterizados. Muchos de estos alérgenos muestran homología de secuencia con las proteínas de diferentes tejidos vegetales, tales como profilinas (Ole e2), la superóxido reductasa (Ole e5), proteínas ligadoras de calcio o polcalcinas (Ole e3 y Ole e8), proteínas transferidoras de lípidos (LTPs) como Ole e7 y 1,3-betaglucanasas (Ole e9). Ole e10 es una proteína que captura carbohidratos, Ole e11 es una pectinmetil esterasa y Ole e12 una isoflavona reductasa (Quiralte J, 2007; Rodríguez R, 2001; Villalba M, 2014).

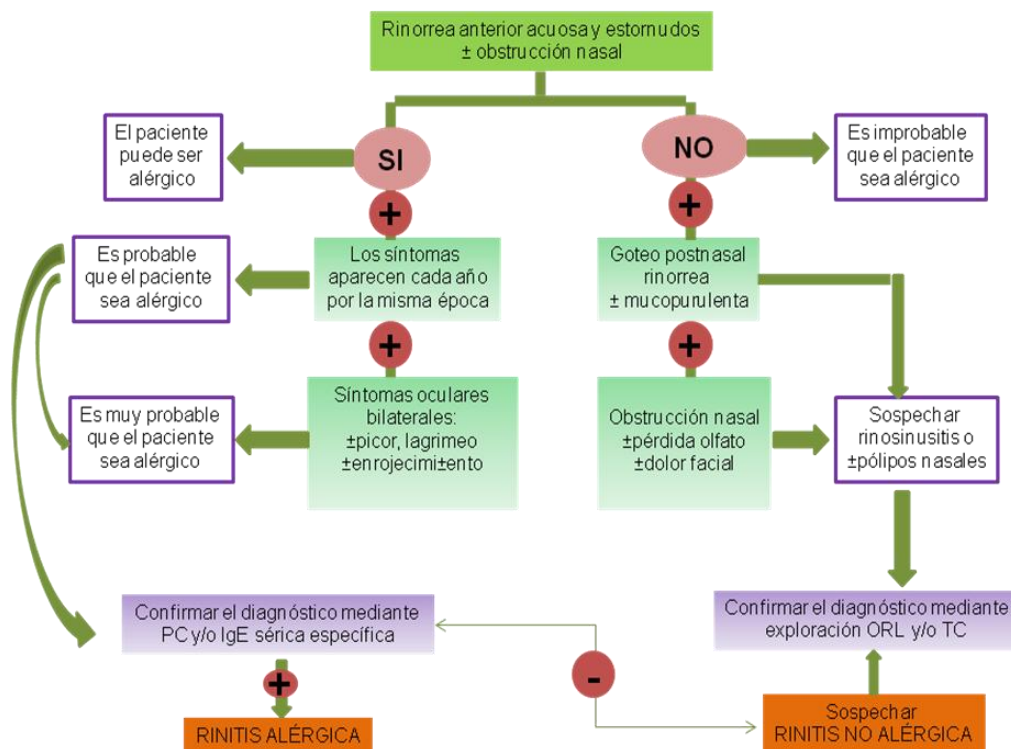
#### **5.4. Diagnóstico de la rinitis alérgica sistémica y local**

El diagnóstico de la rinitis alérgica es fundamentalmente clínico. La historia familiar de alergia, la estacionalidad de los síntomas, la coincidencia de síntomas oculares y nasales, y la relación con la exposición a epitelios, a pólenes o a polvo doméstico, son datos clínicos con alto valor predictivo en el diagnóstico de sospecha de rinitis alérgica. Clínicamente, la RAL y la RA sistémica presentan un patrón de síntomas nasales muy similar (Rondón, 2012), con prurito nasal, rinorrea acuosa y estornudos en salvas como síntomas más frecuentes, y rinorrea acuosa y obstrucción nasal como síntomas de mayor intensidad. Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas entre sujetos RAL y RNA, siendo más frecuente la rinorrea mucosa en sujetos RNA

( $p < 0.001$ ) así como la obstrucción nasal ( $p = 0.001$ ), siendo ésta además más severa ( $p = 0.021$ ) que en el grupo RAL. Además, según varios estudios, la mayoría de los pacientes con RAL refieren rinitis persistente con síntomas graves o moderados (Rondón, 2011), frecuentemente asociados a conjuntivitis (25% al 57%) y asma bronquial (33% al 47%) (Rondón C, 2007; Rondón C, 2008; Rondón C, 2012). En el más reciente de estos estudios (Rondón, 2012) se observa también que más del 36% de los pacientes con RAL estudiados refieren un inicio de los síntomas en la infancia, lo cual indica que no se trata de una enfermedad limitada a la edad adulta, y que es necesario realizar estudios epidemiológicos prospectivos tanto en la población adulta como pediátrica para profundizar más en estos hallazgos y poder definir con mayor precisión la prevalencia, sintomatología, severidad, aeroalérgenos implicados y comorbilidades asociadas de la RAL.

Debido a que el mecanismo patogénico de la rinitis alérgica es una reacción de hipersensibilidad inmediata, es imprescindible para establecer su diagnóstico poner en evidencia la presencia de IgE específica, libre o fijada a células, mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Hasta hace muy pocos años, el diagnóstico de rinitis alérgica estaba basado en una historia clínica sugestiva con síntomas de rinitis junto con una prueba cutánea mediante prick test positiva y/o determinación de IgE sérica específica para alérgeno (Bousquet J, 2008; van Rijswijk, 2005). Por tanto, la rinitis era diagnosticada como no alérgica cuando una causa alérgica había sido descartada mediante un prick test negativo y la ausencia de IgE específica en suero (Ng ML, 2000; Powe DG, 2003; Rondón, 2007; van Rijswijk, 2005) (Figura 14).



**Figura 14:** Algoritmo diagnóstico de la rinitis alérgica (Bousquet J, 2008).

Previo a la realización de la prueba cutánea y/o la determinación sérica de IgE específica para alérgenos sospechosos, la exploración nasal es paso inicial obligado en la evaluación de los sujetos que presenten síntomas sugestivos de rinitis alérgica. Así, por su estructura cavitaria, las fosas nasales precisan de la exploración visual mediante la rinoscopia y la endoscopia nasal.

### **-Rinoscopia y endoscopia nasal**

Mediante estas técnicas se valora el aspecto y coloración de la mucosa, la cantidad, consistencia y coloración de las secreciones, las desviaciones y perforaciones septales, la existencia de hipertrofia de cornetes y la presencia de pólipos o

Figura X: Algoritmo diagnóstico de la rinitis alérgica. Tomado de ARIA 2008. **cavum** (Figuras 15-18).

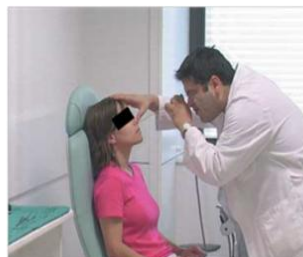
La endoscopia nasal permite una excelente observación de todas las estructuras de la cavidad nasal, ya que permite visualizar áreas tradicionalmente inasequibles a la exploración con la rinoscopia anterior.

Como contraindicaciones de ambas técnicas incluimos la alergia a alguno de los componentes de la anestesia o vasoconstrictor empleados para su realización y la poca colaboración del paciente, especialmente en niños.

Un aspecto brillante de la mucosa al reflejo de la luz y una coloración blanco-azulado de ésta, acompañado de un aspecto rosa-grisáceo de los cornetes, debe hacer sospechar el origen alérgico de la rinitis. En las fases asintomáticas la mucosa suele tener un aspecto normal, aunque puede producirse un edema crónico en los pacientes que han sufrido la rinitis durante periodos prolongados. Durante las fases de exposición al alérgeno, suele apreciarse un edema bilateral, localizado habitualmente en el cornete inferior, que aparece inflamado y cubierto de secreciones acuosas. La secreción nasal acuosa suele ser consecuencia de una rinitis alérgica aunque también se puede manifestar de forma ocasional con una secreción seromucosa de aspecto blanquecino que, en ocasiones, puede ser amarillenta, debido a la abundancia de eosinófilos.



**Figura 15:** exploración nasal mediante rinoscopia anterior utilizando un espéculo de Killian y fuente de luz.



**Figura 16:** exploración nasal mediante endoscopio nasal rígido.



**Figura 17:** Exploración endoscópica nasal mediante endoscopio flexible.



**Figura 18:** Endoscopia nasal en un paciente con rinitis alérgica donde se observa una mucosa nasal pálida e hipertrofia del cornete inferior.

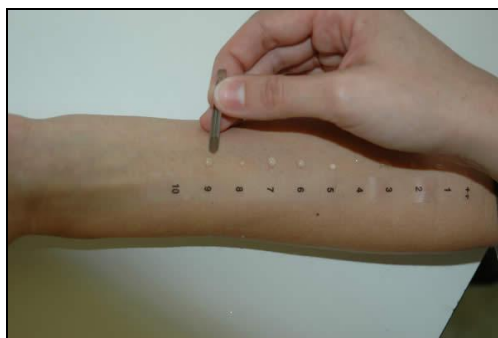
### **-Prueba cutánea**

Es el instrumento fundamental para demostrar una reacción alérgica IgE mediada, siendo la prueba intraepidérmica o prick test el método de referencia por su relativa

sencillez técnica, comodidad para el paciente, rapidez, bajo coste, seguridad, alta sensibilidad y su alta correlación con los síntomas y las pruebas de provocación. Demuestra la existencia de IgE específica en la superficie de los mastocitos dérmicos y desencadenan en pacientes sensibles una respuesta cutánea inmediata pruriginosa caracterizada por una pápula debida a la extravasación de plasma, ocasionada por la histamina liberada por los mastocitos, rodeada de un halo periférico eritematoso ocasionado por la dilatación de las arteriolas debido a un reflejo axónico. No obstante, es importante valorar la relevancia clínica de los alérgenos positivos en la prueba cutánea en el contexto de la historia clínica.

Hay tres factores fundamentales en la práctica de las pruebas cutáneas: los extractos alérgenos a utilizar, la técnica de realización y la lectura e interpretación de los resultados obtenidos. Para su realización, es necesario conocer los aeroalérgenos más prevalentes de la zona y utilizar extractos alérgenos biológicamente estandarizados y con un correcto proceso de fabricación con potencia y composición conocidas.

Se han descrito diversas técnicas para realizar las pruebas cutáneas (*prick-test*; *prick-by-prick*, *scratch-test*, *ruber-test*, intradermorreacción y epicutáneas), si bien en la actualidad las más utilizadas y recomendadas son las que se realizan mediante el método de *prick-test* ya que es simple, seguro, rápido, indoloro, de bajo coste y elevada sensibilidad. La técnica de *prick test* consiste en la punctura de la piel con una lanceta tras la aplicación de una gota del alérgeno a testar (Figura 19). Se realiza generalmente, en la cara volar del antebrazo, depositando las gotas de los alérgenos a una distancia entre ellas de al menos 2,5 cm, no utilizando los 5 cm anteriores a la muñeca y los 3 cm posteriores a la fosa cubital. A los 15-20 minutos se realiza la lectura de la prueba, considerándose como positivas las pápulas mayores de 3 mm de diámetro (similar al control positivo con histamina) o 3 mm mayores al resultado del control negativo (suero salino 0,9%).



**Figura 19:** prueba cutánea intraepidérmica o *prick test*

Debemos tener en cuenta que para su correcta interpretación se deben de suprimir la administración de antihistamínicos H1, antidepresivos tricíclicos, fenotiacidas, corticoesteroides tópicos. Los corticoides orales a dosis bajas (menos de 10 mg) no alteran de forma significativa las pruebas, y tandas cortas de 30 mg de prednisona o equivalentes durante una semana tampoco.

No existen contraindicaciones para la realización de las pruebas cutáneas mediante la técnica de prick-test, pero su uso puede verse limitado en lesiones cutáneas extensas (dermatitis atópica), en pacientes con síntomas agudizados y en embarazadas. No se pueden realizar, debido a los problemas de interpretación, en los pacientes que presentan dermografismo.

#### ***-Determinación de IgE sérica total y específica***

La determinación de la eosinofilia y la IgE sérica total no aporta datos significativos en el estudio de la rinitis (Mygind N,1978). De hecho, entre el 35 y 50% de sujetos con rinitis alérgica cursan con una IgE en intervalo dentro de la normalidad y el 20% de la población normal muestran valores elevados. Por tanto, la determinación de los niveles de IgE total tiene muy poca especificidad y es de escasa utilidad, por lo que no debe emplearse rutinariamente en el estudio de la rinitis alérgica. Su determinación es llevada a cabo por diversos métodos de inmunoanálisis y, aunque en un principio se utilizaron casi exclusivamente las técnicas isotópicas de radioinmunoanálisis (RIA), hoy en día la mayoría de los laboratorios utilizan el enzimoimmunoanálisis ya que, en la

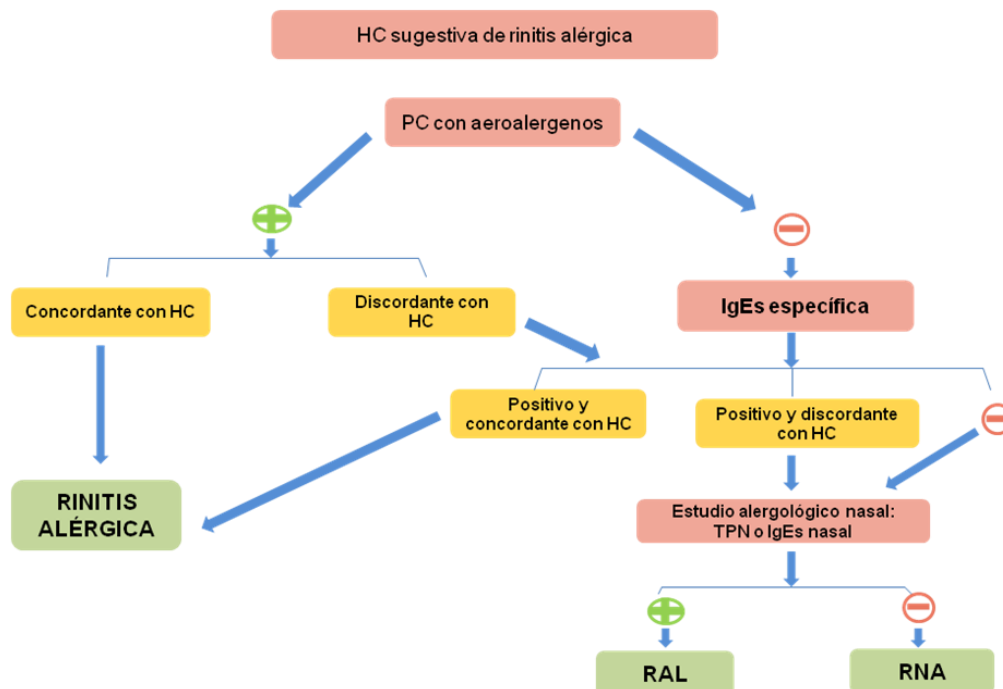
práctica, es igual de eficaz, con la ventaja de no precisar isótopos. En la actualidad en la mayoría de los laboratorios se emplean métodos automatizados.

La determinación de la IgE específica es una prueba semicuantitativa útil en el diagnóstico etiológico de la rinitis alérgica cuando las pruebas cutáneas no se pueden realizar o su interpretación es difícil o discordante con la historia clínica. Si se realizan con alérgenos estandarizados se correlacionan bien con las pruebas cutáneas, a pesar de ello hay que considerar que son menos sensibles que éstas (Dykewics MS, 1998; Gendo K, 2004). El primer método empleado para su determinación fue el RAST (del inglés, radioallergosorbent test) pero, en estos momentos en nuestro medio el más utilizado es una modificación del RAST mediante una técnica de enzimoimmunoensayo en fase sólida totalmente automatizado que le aventaja en sensibilidad, manteniendo una adecuada especificidad.

Otra de las técnicas utilizadas para la determinación de IgE específica para alérgeno es el método ELISA (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay). Se realiza en placas de 96 pocillos con alta capacidad de superficie de unión a proteínas, que se fijan con una solución del extracto a testar. Se utiliza un suero como control positivo con altos niveles de IgE, así como varios sueros como controles negativos no expuestos. Las placas activadas se bloquean con albúmina bovina sérica o cualquier solución de bloqueo para evitar la unión inespecífica de proteínas a la misma, y después se incuban con el suero a estudio. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario anti-IgE humana marcado con una enzima, y se revela con su sustrato específico para dar una señal de color. Los resultados se miden en unidades de absorbancia, y la señal obtenida será proporcional a la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo formados.

En definitiva, hasta hace pocos años, la sospecha clínica de rinitis alérgica junto con la demostración de un mecanismo mediado por IgE (prueba cutánea o prick test y/o determinación sérica de IgE específica positivas) concordante con la historia clínica, era suficiente para diagnosticar a los pacientes de rinitis alérgica. Sin embargo, la

descripción de la RAL como un nuevo fenotipo de rinitis alérgica y la estimación de una elevada prevalencia entre los pacientes con rinitis evaluados en nuestro medio (25.7%) (Rondón, 2012) pone de manifiesto la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial correcto entre RA y RNA. Así, dado que los sujetos con RAL no muestran una respuesta positiva al test convencional de atopia sistémica (prick test e IgE sérica específica negativos), el diagnóstico se basa exclusivamente en una respuesta positiva al test de provocación nasal con alérgeno y/o síntesis local de IgE (Carney, 2002, Huggins y Brostoff, 1975; Rondón, 2012). Teniendo esto en cuenta, en 2010 Rondón y col. (Rondón, 2010) propusieron un nuevo protocolo diagnóstico en rinitis alérgica, recomendando la realización del test de provocación nasal con alérgenos (TPN) y determinación de IgE específica nasal en pacientes con historia clínica sugestiva de rinitis alérgica, en los que el prick test y la determinación de IgE específica en suero resulten negativos o discordantes con la historia clínica (Figura 20).



**Figura 20:** Algoritmo diagnóstico de RAL. Adaptado por Rondón y col. (Rondón, JIACI 2010)



### ***-Test de provocación nasal con alérgeno (TPN)***

Los primeros datos sobre la realización de un TPN fueron descritos por Charles Blackley en 1873, quien aplicó granos de polen de forma directa sobre la mucosa nasal. En la década de 1970 aumentó el interés por esta técnica para su utilización en la práctica clínica diaria, con el objetivo de reproducir la reacción alérgica en la mucosa nasal en condiciones controladas y así poder estudiar los aspectos fisiopatológicos, inmunológicos y farmacológicos de la rinitis alérgica (Holopainen E,1976; Schlenter W,1982).En la década de los noventa, se realizaron diversos trabajos sobre la provocación nasal, enfocados principalmente en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la reacción nasal y su respuesta a los diferentes fármacos. En 1994 se publicó un consenso internacional sobre el diagnóstico y tratamiento de la rinitis en el que se valoró la provocación nasal como técnica diagnóstica de la rinitis alérgica (International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994). El TPN puede ser definido como la forma de reproducir de modo controlado la respuesta de la mucosa nasal a la exposición de alérgenos, irritantes o sustancias que desencadenan una respuesta que se caracteriza por prurito nasal, estornudos en salvas, rinorrea y edema de la mucosa nasal.Está indicado en la confirmación diagnóstica de la rinitis alérgica, principalmente en los pacientes sensibilizados a varios alérgenos, para valorar la significación clínica de cada uno de ellos, y también cuando existen discrepancias o dificultades en la valoración de las pruebas cutáneas y/o pruebas diagnósticas cutáneas y/o serológicas (Desrosiers M,1998; Dordal MT, 2011).También está indicada para la realización de estudios de investigación de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la respuesta nasal a alérgenos, en la valoración de la respuesta a fármacos, en el estudio de enfermedades respiratorias alérgicas de origen laboral y en la monitorización de la respuesta clínica tras la administración de la inmunoterapia específica o fármacos en pacientes con rinitis alérgica.

La provocación nasal no tiene contraindicaciones absolutas. No obstante, se aconseja tener precaución en caso de asma bronquial inestable, a pesar del poco riesgo descrito en la realización de esta prueba diagnóstica. En los pacientes con perforación septal y obstrucción nasal total o muy intensa, es muy difícil la valoración objetiva de la obstrucción nasal que se produce tras la estimulación nasal con alérgeno, lo que dificulta la interpretación de la prueba. Se debe realizar en una fase asintomática de la enfermedad o en el caso de alérgenos perennes, con síntomas leves que no pueda interferir con los resultados de la misma.

Se deben retirar los antihistamínicos orales una semana antes de la realización de la prueba y los tópicos, cuatro días antes. Los corticoides tópicos 48-72 horas y los descongestionantes nasales tópicos u orales 48 horas antes de la prueba. Se debe evitar 48 horas antes el uso de tabaco y el consumo de alcohol.

El lugar donde se realiza el TPN se debe mantener a una temperatura y humedad constantes (entre 20-22 °C y un 40-60% de humedad). Durante la realización de la prueba el paciente debe permanecer en una postura de reposo y evitar el ejercicio físico intenso o brusco, ya que puede alterar la respuesta nasal. Se debe evitar su realización en las 4 semanas posteriores a una infección vírica de las vías respiratorias.

La estandarización de los extractos alérgénicos es fundamental para la precisión, seguridad y reproducibilidad de cualquier procedimiento diagnóstico incluida la provocación nasal. Por eso, es preferible que los alérgenos se reconstituyan el mismo día de la prueba.

Se han descrito múltiples formas de aplicación del alérgeno, dependiendo de la presentación de éste, del lugar y de la forma de aplicación. El alérgeno se puede presentar para su aplicación en solución, en forma de polvo e incluso, en su forma natural, como podría ser la aplicación de granos de polen directamente sobre la mucosa nasal, si bien la aplicación en solución es la más universalmente empleada.

Atendiendo al lugar de aplicación, se puede realizar la aplicación en una (unilateral) o dos fosas nasales (bilateral), siendo ésta última considerada la más fisiológica. En las provocaciones nasales unilaterales, las variaciones de la obstrucción nasal fisiológica o ciclo nasal nos puede llevar a interpretaciones erróneas de la prueba, precisándose en estos casos también la valoración de la fosa contralateral. Diferentes métodos han sido descritos para la aplicación del alérgeno (pulverización con válvulas atomizadoras, mediante discos de pequeño tamaño impregnados con una cantidad prefijada de alérgeno, nebulización del alérgeno), siendo el método más fiable y seguro la instilación sobre el cornete inferior de pequeñas cantidades de solución con el alérgeno a testar mediante micropipetas (figura 21).



**Figura 21:** Aplicación nasal de extracto con micropipeta en cabeza de cornete inferior.

En la práctica clínica habitual, es recomendable la aplicación de diferentes concentraciones para poder valorar la dosis/respuesta, y así poder conocer la sensibilidad del paciente a dicho alérgeno. Se ha utilizado como concentración de inicio la necesaria en prueba cutánea (prick-test) para producir una pápula de 3mm de diámetro o bien una dilución 1/100 de la concentración utilizada en un prick-test positivo.

El intervalo de aplicación de los alérgenos varía entre 15 y 60 minutos, administrándose las dosis prefijadas hasta la positividad de la prueba o hasta administrar la última dosis sin respuesta valorable (negativa). Para evitar el efecto “priming” anteriormente descrito, entre diferentes pruebas de provocación nasal debe existir como mínimo una semana de intervalo.

Es importante la administración previa del diluyente (suero fisiológico o suero fisiológico con seroalbúmina humana 0,03%) para valorar el posible efecto irritante, que podría repercutir en la interpretación de la prueba.

En la actualidad, el TPN con alérgeno es la técnica de elección para el diagnóstico de RAL (Carney, 2002; López, 2010; Rondón, 2007; Rondón 2008; Wedbäck A, 2005) por su elevada especificidad y su mayor sensibilidad que la determinación de IgE específica, triptasa o ECP en el lavado nasal (Rondón, 2007; Rondón, 2008; Rondón, 2009; López S, 2010). Una gran limitación en la clínica diaria ha sido el elevado consumo de tiempo para su realización además de ser una técnica que no está disponible en todos los centros y necesita de personal entrenado. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un nuevo protocolo de TPN con múltiples alérgenos (Rondón, 2011) administrados de forma secuencial en una sola sesión (TPN-M) que ha permitido reducir en gran medida el tiempo de realización y ha demostrado ser útil, sensible, específico y reproducible para el despistaje de pacientes con RAL. La aplicación secuencial de varios alérgenos en una sola sesión no produce ninguna respuesta irritativa y muestra el 100% de concordancia con el gold Standard (TPN con un alérgeno), logrando una reducción en el 75% en el número total de visitas requeridas para el diagnóstico final en el grupo de pacientes con RNA y una reducción del 55% en pacientes con RAL comparado con los resultados del TPN con un solo alérgeno.

La respuesta nasal con alérgenos se puede valorar mediante sistemas variados. Uno de los más utilizados es la evaluación de las diferentes manifestaciones clínicas que se producen. De forma general, podemos considerar el prurito nasal y velopalatino, los estornudos, la secreción nasal y la obstrucción nasal como los síntomas que serán valorados tras el TPN mediante una puntuación ("score") de síntomas previamente definido. Este tipo de valoraciones clínicas por puntuación se puede considerar semicuantitativa y subjetiva. En algunos estudios de investigación, se ha utilizado la escala visual analógica (EVA) para monitorizar los síntomas.

Sin embargo, para poder valorar la respuesta al alérgeno de forma más objetiva y cuantitativa, se utiliza la valoración instrumental de la obstrucción nasal. Así, la exploración objetiva de la obstrucción nasal se puede realizar, de manera directa, a través de la valoración de las aéreas o volúmenes de la cavidad nasal o, de forma indirecta, valorando los flujos y resistencias de la vía nasal (Figura 22).



**Figura 22:** Métodos objetivos para valorar la obstrucción nasal .Tomado de Nathan RA, 2005.

En la actualidad, los métodos más utilizados en la valoración de la obstrucción y la permeabilidad nasal son la rinometría acústica y la rinomanometría anterior activa informatizada (Mygind N, 1997; Nathan RA, 2005).

### **-Rinomanometría**

Esta técnica nos va a permitir valorar de forma objetiva las resistencias nasales. Se puede realizar por diferentes métodos, que se clasifican dependiendo de si se realizan de forma activa, haciendo respirar al paciente o, de forma pasiva, haciendo pasar un flujo de aire a una determinada presión y permaneciendo el paciente en apnea, o si se valora la presión a nivel anterior a través de las narinas, o a nivel posterior en nasofaringe a través de la cavidad oral o de la nasal. Así, los

métodos utilizados se podrían clasificar en rinomanometría anterior (activa o pasiva) y rinomanometría posterior (activa pernasal o activa peroral), siendo la rinomanometría anterior activa la más empleada para valorar de forma indirecta la obstrucción y permeabilidad nasal.

▪ ***Rinomanometría anterior activa***

Es considerada la técnica rinomanométrica más fisiológica, práctica y sencilla de realizar y en la que la resistencia nasal se calcula por el análisis de las curvas de presión-flujo y presión-volumen. Es una técnica muy sensible y específica, pero no se puede realizar en pacientes muy obstruidos y/o con un gran componente secretor, y necesita una buena colaboración del paciente para su realización. En los últimos años se ha utilizado de forma informatizada mediante un microprocesador automatizado (Clement PA, 1997; Malm L, 2000).

Con esta técnica se miden las resistencias a lo largo de todo el ciclo respiratorio nasal (inspiración y espiración) y se mide el flujo a diferentes presiones diferenciales que previamente han sido estandarizadas. Se puede realizar con olivas nasales, máscara nasal o facial, siendo ésta el mejor método para valorar el flujo (Clement PA, 1984) (Figura 23).

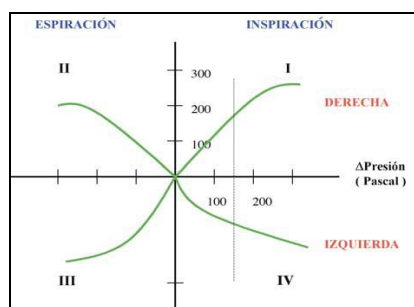


**Figura 23:** Mascarilla facial para la realización de rinomanometría anterior activa.

Se considera necesaria la realización de una exploración postaplicación de un vasoconstrictor tópico para poder discriminar entre obstrucciones originadas por alteraciones vasculares (hipertrofia de cornetes) y anatómicas (dismorfias septales).

El registro se debe realizar durante una respiración normal y se recomienda valorar un mínimo de 3 a 5 ciclos respiratorios. El paciente debe estar en reposo al menos 30 minutos antes de la valoración, no haber utilizado 24-48 horas antes fármacos locales o generales capaces de modificar las resistencias nasales, evitar irritantes nasales 12 horas antes (alcohol y tabaco), y mantener el ambiente de exploración a una temperatura y humedad relativa constantes.

Los valores de flujo y presión se registran sobre un sistema de coordenadas (flujo sobre el eje de ordenadas y presión sobre eje de abscisas). La inspiración se representa a la derecha del eje de ordenadas y la espiración, a la izquierda. Así, los datos de la fosa nasal derecha se representan sobre los cuadrantes I y III y los de la fosa nasal izquierda en los II y IV (figuras 24 y 25).

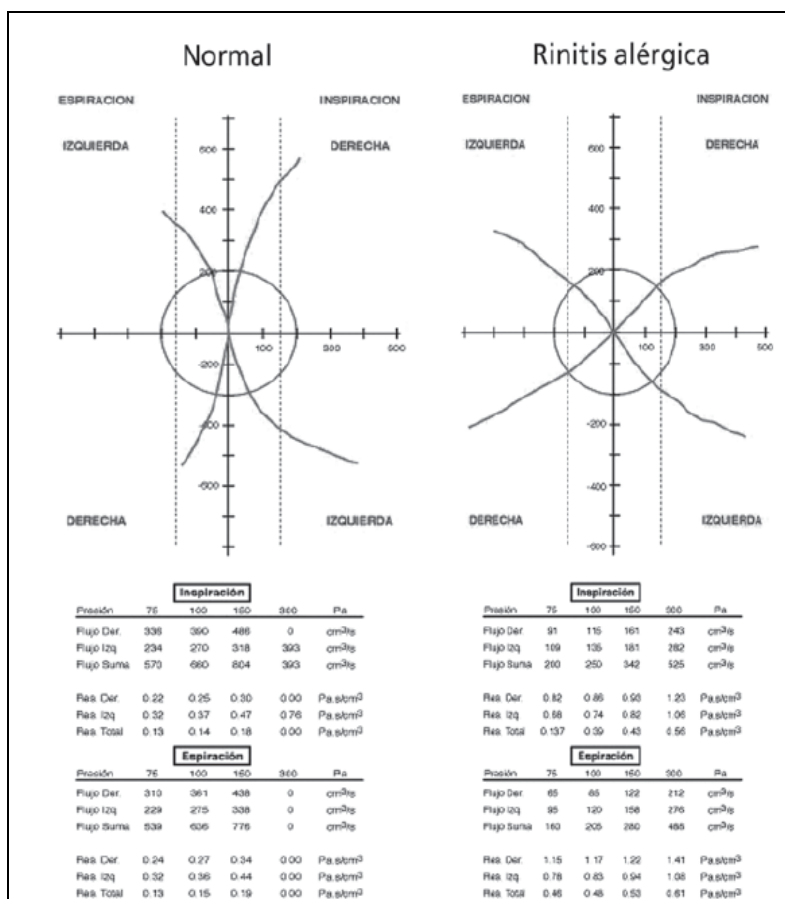


**Figura 24** :Registro de flujos y presiones sobre un eje de coordenadas, en el que se representa el flujo en ordenadas, la presión en abscisas, la fosa nasal derecha en cuadrante I y III y la fosa nasal izquierda en cuadrantes II y IV.

Los resultados rinomanométricos deben ser expresados en unidades internacionales: la presión en Pascales (Pa), el flujo en centímetros cúbicos por segundo ( $\text{cm}^3/\text{s}$ ) y las resistencias con respecto a una presión determinada, siendo la presión de referencia mayormente utilizada la de 150 Pa. Debido a la disminución de la resistencia en el área valvular durante la inspiración, los valores de resistencia obtenidos en sujetos normales durante la inspiración son menores que durante la espiración.

En nuestro país se dispone de valores de referencia en sujetos normales a través de los estudios realizados por Fabra Llopis (Fabra Llopis JM,1990). Para un flujo total de 150 Pa se consideran normales unos valores de 630 y 700  $\text{cm}^3/\text{s}$  para mujeres y hombres

respectivamente. Los valores de resistencia para cada una de las fosas nasales son siempre inferiores a 0,45 Pa/cm<sup>3</sup>/s, y de 0,22 para las resistencias totales.



**Figura 25:** registros de exploración de permeabilidad nasal mediante Rinomanometría anterior activa en sujeto sin patología nasal (a la izquierda) y con rinitis alérgica (a la derecha).

### ▪ Rinometría acústica

Es una técnica descrita a finales de la década de 1980 por Hilberg y col. (Hilberg O, 2000). Desde el inicio de la década de 1990, diferentes autores iniciaron su utilización en la valoración de la respuesta nasal a los alérgenos (Grymer LF, 1991; Hilberg O, 1989). Es una técnica fácilmente reproducible con un coeficiente de variación pequeño e inferior a la de la rinomanometría anterior activa informatizada. Además, es rápida, no requiere la colaboración activa de los pacientes, pudiéndose utilizar también en pediatría, y no está impedida por una obstrucción nasal intensa. Las áreas nasales

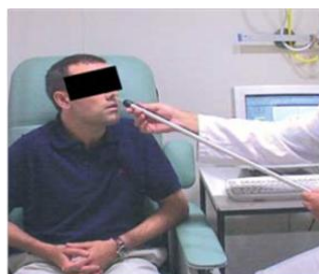


medidas por rinometría acústica se han comparado con las mediciones obtenidas por tomografías computarizadas, encontrándose una buena correlación.

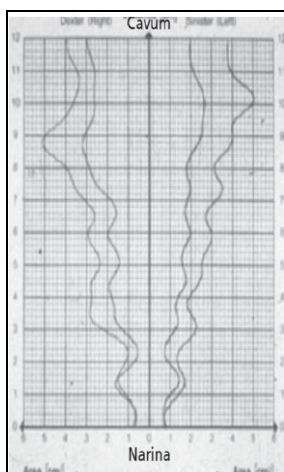
Su principio físico se basa en la propagación de una onda sonora en la cavidad nasal, la cual es parcialmente absorbida y reflejada en la mucosa nasal. El sonido reflejado produce una señal analógica que es captada por un micrófono y que posteriormente se amplifica, se filtra y se digitaliza para ser analizada por el ordenador. Los resultados obtenidos se visualizan en una gráfica donde aparecen las áreas en función de la distancia de las narinas, por lo que también obtenemos una información tridimensional (Figuras 26, 27 y 28).



**Figura 26:** Equipo de rinometría acústica.



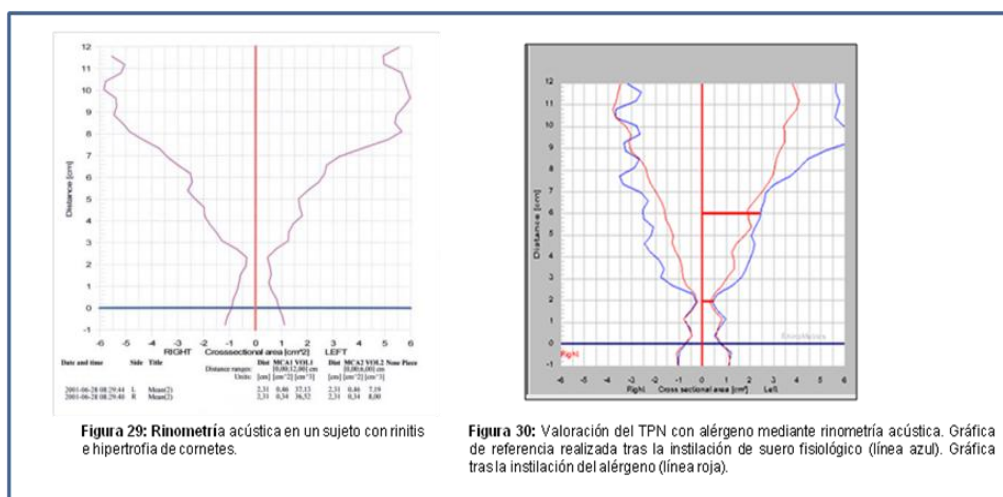
**Figura 27:** Exploración nasal mediante rinometría acústica.



**Figura 28:** registro de rinometría acústica en sujeto sin patología nasal. El registro de resultados va antero-posterior desde la narina hasta el cavum. Registro interior: situación basal, registro exterior: post-vasoconstrictor nasal.

Un dato importante en la valoración de la rinometría acústica es el área transversa mínima (ATM), ya que es la zona más estrecha de las fosas nasales y de ella depende la mayor parte de las resistencias de la nariz al paso del aire. En sujetos normales

siempre se encuentra en la zona anterior de las fosas nasales coincidiendo con la primera o segunda estrechez (escotadura). En cambio, en los casos patológicos, el ATM está en relación con la localización de la patología obstructiva (Figuras 29 y 30). Así, se considera una obstrucción severa si el ATM en situación basal es inferior a 0,4 cm<sup>2</sup> y a 0,5 cm<sup>2</sup> en vasoconstricción. Si la obstrucción nasal es debida a una hipertrofia de cornetes, las áreas de la parte nasal anterior aumentan un 100% con la vasoconstricción. Se puede valorar la localización de la obstrucción en dependencia de la distancia a la que se encuentre el ATM. El descenso del 20-30% en áreas o volúmenes se podría considerar como criterios de positividad en las provocaciones nasales con alérgeno (Pirila T,1998; Scadding GK,1994).



En definitiva, la rinomanometría anterior activa y la rinometría acústica son las técnicas más utilizadas en la actualidad para la valoración de la obstrucción nasal, aunque, debido a su diferente metodología que hace que sus resultados no puedan ser comparados, son técnicas que no se sustituyen y que se pueden considerar complementarias.

### **-Flujo máximo nasal**

Es una técnica de fácil realización, de bajo coste y que puede ser utilizada por el paciente en su domicilio (Figuras 31 y 32). Se puede realizar valorando el flujo nasal en

espiración y en inspiración. Es útil para realizar mediciones seriadas por lo que se utiliza en la monitorización de la respuesta nasal al tratamiento. La reproducibilidad de sus valores es muy dependiente del esfuerzo que se realiza en la maniobra de medición, pudiendo la repetición de esta maniobra inducir por mecanismos reflejos cambios en la obstrucción nasal (Malm L,1997; Wihl A,1988). Posee una aceptable correlación con la rinomanometría anterior activa y la rinometría acústica, pero es menos sensible en la valoración de la respuesta nasal a diferentes estímulos.



**Figura 31:** medidor del flujo máximo nasal inspiratorio, módulo de registro y mascarilla nasobucal.



**Figura 32:** Maniobra de inspiración nasal para la Medición del flujo máximo nasal inspiratorio.

### ***-Lavado nasal y medición de óxido nítrico nasal***

Las técnicas de lavado nasal son una intervención no invasiva, sencilla y de rápida ejecución cuyo empleo ha contribuido a un mejor estudio de la respuesta inflamatoria de la mucosa nasal. Disponemos de varias técnicas, destacando la de Naclerio y Greiff-Gümbert modificada, presentando esta última una mejor reproducibilidad (Belda J, 2001). La técnica de Naclerio consiste en la instilación con pipeta de 4 o 5 mL de suero salino isotónico directo en la cavidad nasal, con el paciente en hiperextensión cervical y cierre del paladar. Posteriormente (10 segundos) el líquido, que será representativo de cavidades nasal y nasofaríngea, se recoge tras flexionar la cabeza y hacer una exhalación nasal.

En el sobrenadante de la muestra de lavado nasal se pueden realizar mediciones de mediadores inflamatorios que muestran la participación activa de distintos elementos celulares en la respuesta inflamatoria nasal como: IgE total y específica (linfocitos T y células plasmáticas), marcadores de activación de eosinófilos (proteína catiónica del eosinófilo (ECP), peroxidasa de eosinófilo (EPO), proteína básica mayor de eosinófilo

(BMP)), marcadores de activación de mastocitos (triptasa, histamina), marcadores de activación de neutrófilos (mieloperoxidasa), citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas, moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1 y CD18) y marcadores de permeabilidad microvascular (albúmina y urea) (Broder I,1974;Jenssen M,1997; Pedersen PA,1981). También pueden detectarse mediadores no proteicos como histamina y sulfidopeptidoleucotrienos. Los niveles detectados en lavado nasal de estos mediadores suelen tener una buena correlación con la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Diversos estudios han demostrado la presencia de IgE específica para alérgeno en muestras de lavado nasal de pacientes con RAL durante exposición natural a alérgenos estacionales (35% de polen de gramíneas/olivo) y perennes (22% de ácaros del polvo (Rondón, 2007; Rondón, 2008) y 64,3% para hongos de la humedad (Fuiano, 2012)). Más recientemente han sido publicados los resultados obtenidos mediante la monitorización rigurosa tras TPN sobre la cinética de producción local de IgE además de mediadores inflamatorios (ECP y triptasa) en pacientes con RAL estacional (Rondón, 2009) y perenne (López S,2010).

El estudio del componente celular mediante citometría de flujo permite diferenciar con gran precisión las poblaciones y subpoblaciones celulares así como cuantificar la expresión de marcadores de activación celular (Kinhult J,2003). Así, durante la exposición natural al alérgeno se ha demostrado que la RA y la RAL presentan un patrón leucocitario-linfocitario muy similar, con niveles elevados de eosinófilos, basófilos, mastocitos, células T CD3+ y CD3+CD4+ en el lavado nasal, en comparación con controles sanos (Rondón, 2007; Rondón, 2008).

En resumen, el análisis del lavado nasal tras la exposición natural o tras TPN con alérgenos nos va a aportar información importante tanto para el diagnóstico como para el conocimiento de la fisiopatología de la RAL. Sin embargo, este test *in vitro* posee una alta especificidad pero una baja sensibilidad para la mayoría de los alérgenos, posiblemente debido al efecto dilución del suero salino utilizado. Existe un método

introducido por Marcucci y Sensi para la detección nasal de IgE específica que evita el efecto de dilución (Marcucci F, 1989). En esta técnica se utiliza un derivado de celulosa con el alérgeno a estudio acoplado que se coloca en un aplicador de dos agujeros cubiertos con una membrana permeable (para evitar la adhesión de la mucosa nasal en el sustrato) y se posiciona por encima del tracto posterior del ostium interno durante 10 minutos. Recientemente Fuiano y col. (Fuiano N, 2012) han aplicado esta técnica encontrándose una positividad concomitante en TPN y determinación nasal de IgE específica a *Alternaria* en alrededor del 70% de los niños con rinitis evaluados.

Por último, teniendo en cuenta que el óxido nítrico es considerado un marcador biológico de inflamación, otra de las técnicas para valorar la inflamación nasal en la rinitis alérgica es el óxido nítrico nasal (ONn), que consiste en la medición de dicho gas en muestras de aire nasal aspirado mediante análisis por quimioluminiscencia. Es una técnica no invasiva aunque su elevado coste hace que su disponibilidad se vea limitada a pocos centros, haciendo que no sea una técnica de uso rutinario en la actualidad.

En resumen, existen múltiples técnicas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la rinitis alérgica. Sin embargo, en el caso de la RAL, los test diagnósticos convencionales (prueba cutánea y determinación sérica de IgE específica) no son de utilidad. En estos casos, el diagnóstico queda basado en el TPN y en la medición de IgE específica nasal. Sin embargo, la baja sensibilidad de la determinación de IgE específica nasal y las limitaciones que presenta el TPN hace necesario encontrar nuevas alternativas de diagnóstico en los pacientes con RAL.

### **5.5. Tratamiento de la rinitis alérgica sistémica y local**

El tratamiento de la rinitis alérgica debe ir encaminado a tratar la inflamación alérgica subyacente, que es persistente aunque el paciente permanezca asintomático, y que debe ser controlada para prevenir su cronificación (Ciprandi G, 1995). Un tratamiento adecuado en edades como la infancia o la adolescencia puede tener, no sólo una

capacidad terapéutica, sino también profiláctica en cuanto al desarrollo de rinitis y/o asma (Bousquet J, 2001; Bustos GJ, 1995).

Es preciso individualizar el abordaje terapéutico, siendo necesario valorar los síntomas que predominen en cada paciente en los diferentes momentos, la frecuencia de aparición (intermitente o persistente) y la repercusión en la calidad de vida (leve o moderada/grave), sin olvidar la presencia de otras enfermedades alérgicas asociadas (conjuntivitis, asma bronquial, dermatitis atópica, alergia alimentaria,...) que pueden modificar el tratamiento inicial, así como la presencia concomitante de sinusitis, poliposis nasal y otitis media, entre otras.

La estrategia del tratamiento consta, en general, de una parte común que incluye medidas de evitación alérgicas y la educación sanitaria.

#### **-Medidas de evitación**

Diversos estudios sobre la eficacia de las medidas de evitación y reducción de alérgenos en el ambiente de las casas, así como los diferentes meta-análisis realizados sobre estos trabajos, han demostrado que, si bien las medidas de saneamiento y evitación son eficaces en cuanto a la reducción de los niveles de alérgenos, no lo son tanto en cuanto a la reducción de síntomas (Sheikh A, 2001; Terrehorst I, 2003). Además, en muchas ocasiones, estas medidas no son suficientes para reducir significativamente la carga alérgica ambiental (Warner JA, 1993).

#### **-Educación del paciente**

La educación sanitaria, además de proporcionar información útil, conlleva un mejor cumplimiento del tratamiento y consigue modular las expectativas del paciente alérgico en cuanto al resultado de las intervenciones terapéuticas a corto y largo plazos. Hay que insistir en el abandono del hábito tabáquico en estos pacientes.

#### **-Inmunoterapia**

Junto con la evitación del alérgeno, la inmunoterapia es, en el momento actual, el único tratamiento que puede alterar el curso natural de la rinitis alérgica e impedir en estos pacientes el desarrollo de asma (Novembre E, 2004; Sheikh A, 2001), la aparición de

nuevas sensibilizaciones e incluso reducir de forma significativa la hiperreactividad bronquial (Marogna M, 2004). Así, la inmunoterapia específica no debería estar relegada al final del tratamiento, sino ser prescrita en fases tempranas de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la eficacia de la inmunoterapia es mayor en los niños que en los adultos, se debe instaurar de forma precoz para evitar la inflamación crónica y la reestructuración de las vías respiratorias (Bousquet J, 2001).

La eficacia de la inmunoterapia es incuestionable en rinitis y asma alérgicas, existiendo en la literatura evidencias de peso para su administración tanto vía subcutánea como sublingual (Ross RN, 2000; Wilson DR, 2003).

Dado que un importante número de pacientes con RAL presenta síntomas persistentes de intensidad moderada a grave, frecuentemente asociados con asma bronquial y conjuntivitis que requiere tratamiento farmacológico continuo con corticoides intranasales y antihistamínicos orales, sería importante poder verificar si estos pacientes se podrían beneficiar con la inmunoterapia específica. El primer estudio piloto observacional abierto realizado por el grupo de Rondón y col. (Rondón, 2011) comparó el efecto inmunológico y clínico de un ciclo de 6 meses de inmunoterapia subcutánea pre-estacional con extracto de gramíneas en 10 pacientes con RAL (grupo de tratamiento activo), frente al tratamiento solo con antihistamínicos y corticoides tópicos intranasales durante la estación polínica en otros 10 sujetos. Los excelentes resultados obtenidos mostraron que el grupo de tratamiento activo presentó un aumento significativo de la tolerancia al alérgeno (evaluado mediante TPN), una reducción significativa de los síntomas y de la gravedad de la rinitis y un aumento del número de días libres de síntomas y de tratamiento. Estos resultados prometedores abrieron el camino para la realización de ensayos clínicos a doble ciego controlados con placebo sobre el efecto de la inmunoterapia en la RAL que arrojarán datos en el futuro próximo sobre la indicación de la IT específica para alérgeno en pacientes diagnosticados de RAL.



## -Tratamiento farmacológico

Hoy día se dispone de un arsenal terapéutico que cubre la práctica totalidad de los síntomas de la rinitis alérgica (Figura 33).



**Figura 33:** tratamiento farmacológico de la rinitis alérgica. Tomado de J Bousquet, Allergy 2008.

De todos ellos, los más usados en la actualidad son los antihistamínicos de segunda generación, tanto orales como tópicos, y los corticoides tópicos.

Recientemente, se cuenta con la posibilidad de utilización de anticuerpos recombinantes humanizados anti-IgE, aptos para el tratamiento del paciente con rinitis-asma (Holgate ST, 2005).

En la fisiopatología de la rinitis alérgica participan varios mediadores entre los que destaca la histamina, que es la responsable de, entre todos los síntomas que caracterizan la rinitis alérgica, del prurito, la rinorrea y los estornudos, y aunque participa junto con otros mediadores en el desarrollo de la congestión o taponamiento nasal, en general, son más efectivos sobre los síntomas clásicos de la rinitis (rinorrea, prurito y estornudos) que sobre la congestión nasal (Bachert C, 1998). Los antihistamínicos actúan bloqueando de forma competitiva y reversible los receptores H1 de la histamina. Los de segunda generación ,además, reducen la liberación de



otros mediadores tales como la triptasa, PGD<sub>2</sub>, los leucotrienos cisteinílicos ,reducen la producción de citocinas y cininas, la expresión de ICAM-1 y la quimiotaxis de eosinófilos (Church MK, 1993) y presentan como ventaja con respecto a los clásicos o de primera generación, la ausencia de efectos anticolinérgicos (sequedad de boca, retención urinaria, palpitaciones, cefaleas), dopaminérgicos (sedación, discinesia y tinnitus), atreviesan en menor grado la barrera hematoencefálica y son relativamente muy selectivos (Campoli-Richards DM, 1990).

Hoy día se considera a los glucocorticoides como las sustancias antiinflamatorias más potentes que existen para el tratamiento de la rinitis alérgica. Antes de que en los años 1930 Eduard Kendall descubriera la cortisona, ya se utilizaban extractos de glándulas suprarrenales para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y en el asma. Desde entonces hasta nuestros días se han ido desarrollando diferentes moléculas glucocorticoideas, no sólo ya para el tratamiento del asma, sino también para el tratamiento de la rinitis, tanto alérgica como no alérgica, con una gran acción antiinflamatoria y un buen perfil de seguridad. Los glucocorticoides tópicos han demostrado ser el tratamiento más efectivo en la alergia respiratoria, tanto para la rinitis como para el asma. Basan fundamentalmente su acción antiinflamatoria en la rinitis alérgica en la inhibición de muchos de los mecanismos inmunológicos implicados. Así, inhíben la captación y el procesamiento del antígeno, inducen una reducción en el número de células presentadoras de antígeno (Holm AF,1995) así como un descenso significativo en el número de eosinófilos y sus productos a nivel de la mucosa nasal, siendo este fenómeno más pronunciado a nivel del epitelio que en la lámina propia (Rak S,1994). En nuestro país se encuentran comercializadas la beclometasona, la budesonida, la fluticasona, el acetónido de triamcinolona y el furoato de mometasona para el tratamiento de la rinitis.Los glucocorticoides orales son muy eficaces en la rinitis y el asma alérgicos, pero los importantes efectos secundarios con su uso a largo plazo los relegan en la actualidad a un tratamiento de último recurso.

Los pacientes con RAL refieren buena respuesta a corticoides intranasales y antihistamínicos orales (Rondón,2007; Rondón,2008), pudiendo ser ésta una característica fenotípica de los pacientes con RAL que ayude a diferenciarlos de los pacientes con RNA. En un estudio reciente publicado por el grupo de Rondón (Rondón, 2013) en el que se evaluaron los primeros 5 de 10 años de seguimiento de un grupo de pacientes con RAL, se observó que los antihistamínicos orales de segunda generación y los corticoides intranasales eran el tratamiento sintomático de rescate más utilizados por los pacientes al inicio del estudio, existiendo un aumento del empleo de los primeros a lo largo de los 5 años de seguimiento con un descenso significativo en el uso de los descongestionantes intranasales y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el uso de antihistamínicos oculares (siendo la conjuntivitis la comorbilidad asociada más frecuente al inicio del estudio con aumento del número de casos después de 5 años) ni de corticoides intranasales ni sistémicos (Tabla 5).

	RAL al inicio (n=176)	RAL a los 5 años (n=176)	P
<u>Antihistamínicos</u>			
•orales	163(92.6)	171(97.2)	0.053
•oculares	65(36.9)	75(42.6)	0.276
<u>Corticoides</u>			
•Intranasales	137(77.8)	140(79.5)	0.696
•sistémicos	9(5.1)	11(6.3)	0.645
<u>Descongestionantes</u>			
•Intranasales	9(5.1)	2(1.1)	0.032
•orales	10(5.7)	9(5.1)	0.814
<u>AINEs</u>	11(6.3)	2(1.1)	0.011

**Tabla 5:** Tratamiento sintomático de rescate empleado en RAL. Tomado de Rondón, JACI 2013.

El nuevo concepto de “vía aérea única” (Bousquet J,2001) incluye las patologías nasal y bronquial, formando parte de una sola entidad influenciada por un proceso inflamatorio común, que puede mantenerse e incluso aumentar por mecanismos interrelacionados. En general, se debe considerar el concepto de alergia respiratoria o “enfermedades de la vía respiratoria global” para diseñar una buena estrategia terapéutica en los

pacientes con asma y rinitis alérgicas, con un enfoque integral, seguro y eficaz (Passalacqua G, 2000).

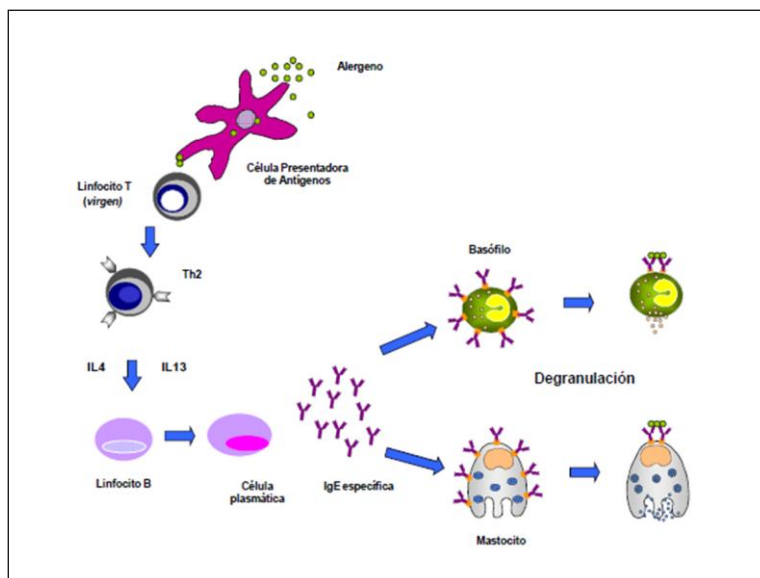
## **6. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS (TAB)**

### **6.1 El basófilo en la reacción alérgica IgE mediada**

La exposición al alérgeno pone en marcha una respuesta inmunológica compleja en la cual participan numerosas células, mediadores, citoquinas, quimioquinas, neuropéptidos y moléculas de adhesión, entre otras, pero en la que la IgE desempeña un papel fundamental.

Las reacciones alérgicas inmediatas tienen características comunes, aunque difieren notablemente en las características de los alérgenos que las desencadenan y en sus manifestaciones clínicas y anatomopatológicas. Al ser una respuesta inmunológica, este tipo de reacciones requieren un período de sensibilización previo tras la primera exposición al antígeno, en el que se sintetizan y liberan anticuerpos IgE específicos a dicho alérgeno. Una gran proporción de éstos se unen de forma reversible por su región Fc a receptores de alta afinidad específicos (FcεRI) que se expresan en la superficie de mastocitos y basófilos (Sutton y Gould, 1993). De este modo, los mastocitos y basófilos quedan sensibilizados frente al antígeno para el que tienen IgE específica unida en su superficie. Aunque la concentración sérica normal de IgE es baja en comparación con la de otros isotipos de Ig, es lo suficientemente alta como para permitir que los receptores FcεRI estén ocupados por moléculas de IgE y los mastocitos y basófilos de todos los individuos estén recubiertos de IgE.

Cuando existe una nueva exposición al alérgeno, éste interacciona con la región Fab de dos o más moléculas de IgE adyacentes de la superficie celular de mastocitos y basófilos, fenómeno que se denomina “puenteo” y que desencadena la activación de estas células (Figura 34).

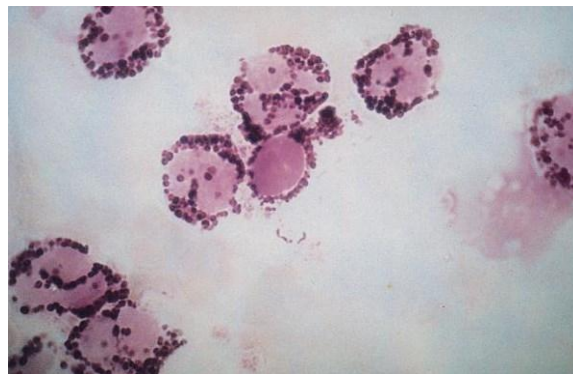


**Figura 34.** Reacción de hipersensibilidad inmediata Tipo I.

La activación de los mastocitos y los basófilos provoca cambios en su membrana celular y desencadena una serie de reacciones enzimáticas en cascada que finaliza con la secreción de un gran número de mediadores preformados en los gránulos celulares (histamina, triptasa, heparina o factores quimiotácticos) mediante un proceso regulado de exocitosis y con la síntesis y la secreción de mediadores lipídicos (leucotrienos y prostaglandinas) (Siraganian, 1988) y de citoquinas (TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-3, GM-CSF) que pueden contribuir a la inflamación alérgica. Algunas de estas citoquinas potencian la expresión de moléculas de adhesión leucocítica (selectina E y moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que facilita la atracción de leucocitos inflamatorios hacia los tejidos. Todos estos mediadores liberados son los responsables de las manifestaciones clínicas características de estos procesos y sus principales efectos son la vasodilatación y la contracción del músculo liso, que ocurren con gran rapidez después de la exposición al antígeno (reacción inmediata) y una reacción retardada que produce principalmente inflamación.

Durante la fase tardía de la respuesta alérgica nasal se produce un reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en la mucosa nasal debido a la acción de citoquinas

y quimiocinas liberadas durante la fase precoz, fundamentalmente por basófilos y mastocitos. Entre ellas encontramos además de basófilos, eosinófilos, linfocitos T CD4+ activados, células CD25+ (receptor de IL-2) y neutrófilos. Debido a que el nivel de histamina se encuentra elevado durante esta fase de la respuesta alérgica, pero no el de triptasa ni PG D2, se considera que esta liberación de mediadores se debe a una activación del basófilo y no a una secundaria activación del mastocito (Iliopoulos O, 1992). Por tanto, dentro de las células implicadas, los basófilos de sangre periférica así como los mastocitos a nivel tisular son células clave en la respuesta alérgica siendo las células efectoras primarias de las reacciones inmediatas mediadas por IgE (Schroeder JT, 2009) (Figura 35).



**Figura 35:** Basófilos activados en sangre periférica.  
Tomado de Laboratorios MSD.

Los basófilos representan en sangre periférica menos del 0,5% del total de los leucocitos (figura 29). Son células de origen hematopoyético (CD34+) que, a diferencia de los mastocitos, completan su diferenciación en la médula ósea y entran en la circulación como células maduras. La IL-3 parece ser un factor importante para su desarrollo, aunque podrían influir otros factores de crecimiento. En condiciones normales no se encuentran en los tejidos, emigrando a éstos cuando se produce una reacción inflamatoria (Pawankar R, 1997; Schroeder JT, 1997). Tienen receptores de alta afinidad para la IgE (FcεRI), sus gránulos citoplasmáticos contienen histamina (probablemente el principal mediador de la fase inmediata en la provocación nasal con

alérgeno), es importante en la respuesta tardía de la reacción alérgica y potencian la síntesis de IgE, ya que liberan IL-4 e IL-13. No sintetizan PGD<sub>2</sub>, pero generan LTC<sub>4</sub> en cantidad similar a los mastocitos (Howarth PH, 2003).

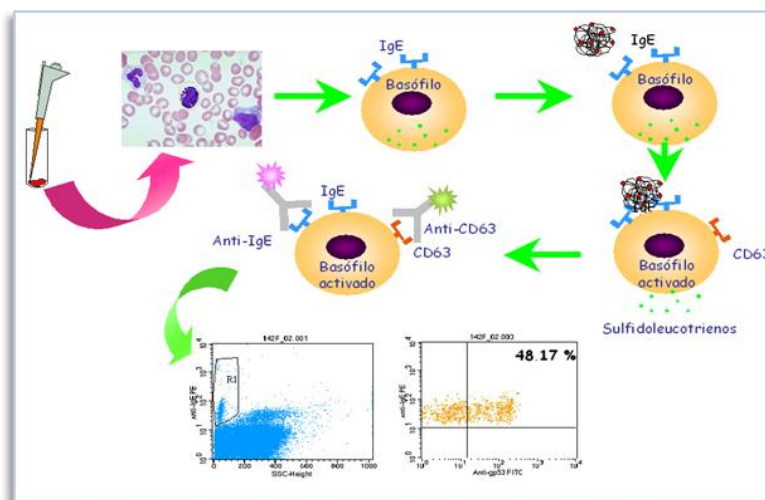
Los basófilos son células escasas en la mucosa nasal pero, en los sujetos con rinitis alérgica, infiltran la mucosa tras la exposición al alérgeno. Pueden detectarse en el epitelio y en la lámina propia a los 60 minutos y persisten hasta una semana (KleinJan A, 2000). También pueden detectarse en el lavado nasal 24 horas tras la provocación nasal con alérgeno.

## 6.2 Activación de basófilos

A lo largo de los años, se han desarrollado varios ensayos para evaluar la presencia de basófilos activados y su respuesta a los antígenos. Una de las primeras aproximaciones es la prueba de liberación de histamina, técnica controvertida debida a su insuficiente sensibilidad y especificidad (Robert GH, 2003). Por este motivo, varios grupos aprovecharon las ventajas de la citometría de flujo para desarrollar nuevas herramientas para monitorizar la activación del basófilo tras estímulos específicos de antígeno, detectando la expresión de marcadores de superficie (Sainte-Laudy J, 1998; Monneret G, 1999). La base de estos ensayos es la demostración de ciertos fenotipos de membrana que aparecen tras la exposición al alérgeno. Así, se describe un aumento de la expresión de CD45 (Gane P, 1993), CD11b, CD11c, una disminución de CD62L (Sainte-Laudy J, 1998) y del número de basófilos positivos para IgE tras la estimulación *in vitro* con el alérgeno. Sin embargo, la mayoría de los artículos publicados hacen referencia a la expresión de CD63 sobre basófilos tras su activación *in vitro* (Moneret-Vautrin DA, 1999; Sainte-Laudy J, 1999; Sanz ML, 2001) o al aumento de la expresión de CD203c (Boumiza R, 2005).

Los basófilos son capaces de liberar el contenido de sus gránulos tras un proceso de activación dependiente del estímulo antigénico. La degranulación que ocurre tras el puenteo de los receptores para la IgE por acción de un alérgeno divalente provoca la fusión intracitoplasmática de los gránulos y la fusión de la membrana de éstos con la

membrana plasmática, con lo que moléculas presentes en la membrana de los gránulos, tales como la molécula CD63, quedan expuestas al exterior y se expresarán en la membrana del basófilo, cuando éste se encuentre activado (Figura 36).



**Figura 36:** Test de activación de basófilos.

El CD63 es un tetraspano, proteína granular de 53 KDa que se expresa, no sólo en los gránulos del basófilo y en la superficie de éste cuando se activa, sino también en los monocitos, macrófagos y plaquetas. Esta proteína es el único marcador conocido que aparece en la superficie del basófilo cuando se activa y su expresión se correlaciona con la degranulación, lo que hace que esta molécula sea un marcador ideal de activación del basófilo (Bochner BS, 2000).

El TAB se realiza con muestras de sangre periférica bien sea completa o a partir de un aislamiento previo de los leucocitos. Y consiste en poner a los basófilos en presencia de diferentes concentraciones de alérgenos para medir posteriormente el aumento de expresión de los marcadores de activación mediante citometría de flujo. Este método consiste en las siguientes fases:

Estimulación y degranulación: En la que los basófilos se incuban con el alérgeno a testar.

Marcaje con anticuerpos fluorescentes: Las células se marcan con anticuerpos monoclonales conjugados a una partícula fluorescente, por un lado para seleccionar

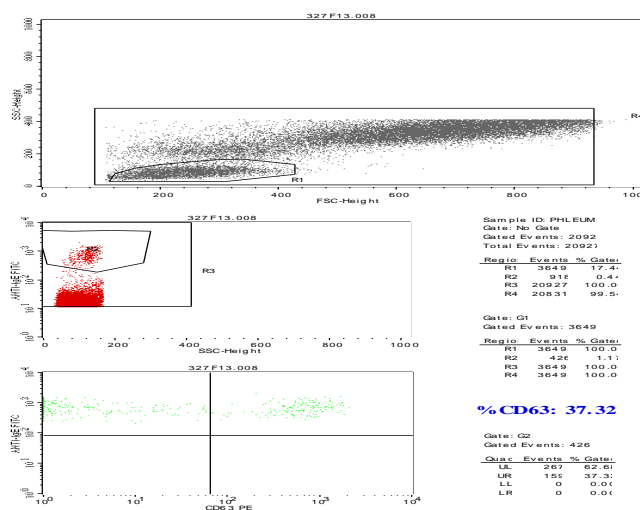
los basófilos (anti IgE, CCR3, CD203c,...) y por otro para detectar la activación de los basófilos (CD63, CD203c).

Lisis y fijación celular: Para la eliminación de los glóbulos rojos y se fijan el resto de células sanguíneas

Adquisición por citómetro de flujo: Posteriormente las determinaciones celulares se realizan en un citómetro de flujo adquiriendo un mínimo de 500 basófilos por muestra y los resultados se analizan mediante el programa del citómetro correspondiente (Figuras 37 y 38).



**Figuras 37:** citómetro de flujo FACSCalibur.



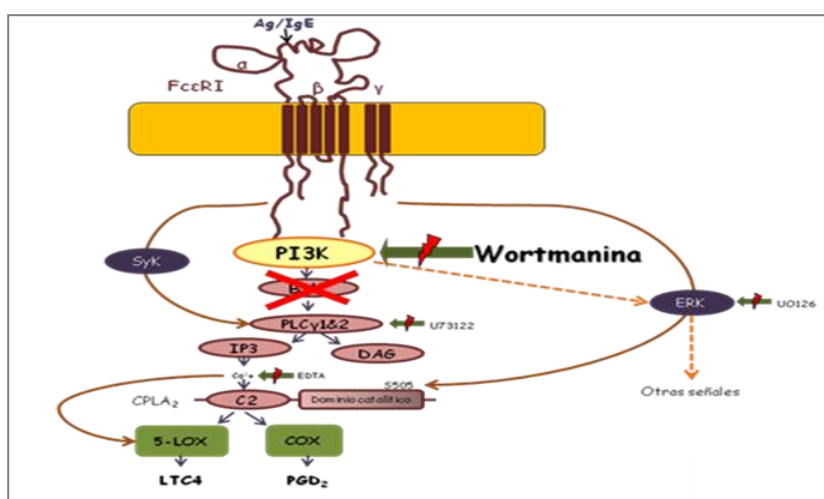
**Figura 38:** TAB positivo a DP en un paciente con RAS por ácaros del polvo.

Los resultados de activación celular se pueden expresar de diferentes formas, como % de células que expresan CD63, CD-sens o el índice de estimulación. En este último consiste en una normalización del porcentaje de expresión de CD63 en células estimuladas respecto al porcentaje de células que expresan este marcador no habiendo estado en contacto con el estímulo. Actualmente no existe un consenso sobre qué forma es la más adecuada.



### 6.3 Inhibición del TAB con *Wortmanina* (WTM)

Los basófilos pueden activarse por un mecanismo inmunológico gracias a que expresan en su superficie receptores de alta [FcεRI] y baja afinidad [FcεRII] para la IgE, pero también pueden activarse por otros estímulos, como las anafilotoxinas (C5a y C3a), el péptido bacteriano f-met-leu-phe, el PAF, la MBP,diversas citoquinas y algunos fármacos. Son más “susceptibles” que los mastocitos a esta activación no inmunológica (Schroeder JT, 1997). En muchas ocasiones es importante tener la certeza de que cuando observamos un incremento de activación del basófilo, este es producido por un mecanismo IgE mediado. Existen varias formas indirectas de analizarlo, uno sería la caída de los niveles de activación de basófilos medida en diferentes muestras en los pacientes. Otra forma es mediante la utilización de inhibidores de la cascada de activación de los basófilos. La wortmanina es un inhibidor de la fosfatidil-inositol-3quinasa, que participa en la vía de transducción de señal responsable de la secreción de histamina después de la estimulación del receptor de IgE de alta afinidad (Ali K, 2004; Knol EF,1991; Yano, 1993), de tal manera que su empleo en una fase de pre-tratamiento permite demostrar una estimulación del basófilo mediada por IgE específica para alérgeno (Figura 39).



**Figura 39:** papel de la Wortmanina en la inhibición de la activación específica del basófilo mediada por IgE.

## 6.4 Uso del TAB en el diagnóstico de la patología alérgica

Hasta 1998 existían solo algunos estudios publicados, sobre todo por Sainte-Laudy y el grupo de Sabbah (Sabbah A,1996; Sainte-Laudy J, 1994; Sainte Laudy J,1998), donde proponían el uso de la citometría de flujo como una técnica novedosa para el estudio de las enfermedades alérgicas. Desde entonces, otros grupos han confirmado el interés en el empleo de esta técnica (Moneret-Vautrin DA,1999; Paris-Kohler A, 2000).

El TAB es en la actualidad una técnica validada para el diagnóstico *in vitro* de la sensibilización a los aeroalérgenos (Ebo DG,2004; Pâris-Köhler A,2000; Sanz ML,2001; Saporta M, 2001), veneno de himenópteros (Sainte-Laudy J,2000), látex (Sanz ML, 2003), contrastes radiológicos (Chirumbolo S, 2013; Salas M y col., 2013) y diversos medicamentos (Gamboa PM, 2004; Gómez E, 2009; Monneret G,2002; Sanz ML, 2002; Sanz ML, 2005; Torres MJ, 2004). Es por tanto un ensayo reproducible con una sensibilidad y especificidad elevadas para algunos alérgenos (Pâris-Köhler,2000).

### 6.4.1 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a alérgenos

Resultados publicados a lo largo de los últimos veinte años han demostrado que el TAB es una herramienta útil y fiable en el diagnóstico de la patología alérgica por diferentes aeroalérgenos ambientales como pólenes (Cozon G, 1999; Hauswirth AW, 2002; Paris-Kohler A, 2000; Sanz ML, 2001; Saporta M,2001) o ácaros del polvo (Cozon G,1999; Sanz ML, 2001).

La alergia al polen de cupresáceas es una polinosis de afectación mundial, pero su diagnóstico *in vitro* es difícil. En el año 2000 Pâris-Köhler A y col. evaluaron el papel de la activación IgE específica del basófilo mediante citometría de flujo para el diagnóstico *in vitro* de un grupo de pacientes con historia sugestiva de alergia al polen de ciprés, con prueba cutánea y provocación nasal positivas para dicho alérgeno, comparado con los niveles de IgE específica en suero. El TAB presentó una mayor sensibilidad (91,2%) que la determinación sérica de IgE específica (76%), con una especificidad del 100% (Pâris-Köhler A, 2000), demostrando ser un método diagnóstico fiable en pacientes alérgicos al polen de ciprés.

Un año después, el grupo de Sanz y col.(Sanz ML,2001) utilizaron la citometría de flujo mediante un procedimiento optimizado para evaluar la expresión de CD63 y la IgE específica en basófilos aislados de pacientes sensibilizados a otros aeroalérgenos (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *Lolium perenne*). La optimización de la técnica incluía la manipulación de células, el uso de alérgenos estandarizados en fase fluida y la selección adecuada de anticuerpos monoclonales marcados (anti-IgE-FITC y anti-CD63-PE). Todos los pacientes del estudio mostraron un aumento significativo del porcentaje de basófilos activados tras estimulación *in vitro* con dichos alérgenos en comparación con el grupo control ( $p<0.001$ ), lo cual apoya la afirmación de que la expresión de CD63 refleja activación de basófilos en pacientes con alergia a aeroalérgenos. Además, encontraron una correlación estadísticamente significativa entre el TAB y la prueba cutánea así como con el test de liberación de histamina, la producción de sulfidoleucotrienos antígeno-específica y la determinación sérica de IgE, considerándose el TAB un método altamente fiable para la detección de la alergia mediada por IgE frente a alérgenos inhalantes.

Los pacientes alérgicos a un solo alérgeno (monosensibilizados) difieren de los alérgicos a varias especies de alérgenos (polisensibilizados), ya que los primeros tienen menores niveles de IgE total en suero (Bousquet J,1991) y sus células mononucleares de sangre periférica producen menores cantidades de IL-4 e IgE *in vitro* (Péne J,1994). Se ha observado que durante la estación polínica pacientes monosensibilizados experimentan aumento en los niveles de IL-4 mientras que los polisensibilizados no sufren cambios en las cifras de IL-4 ni de IgE liberadas (Lagier B, 1995). En este sentido, el grupo de Saporta (Saporta M,2001) se planteó si los resultados del TAB podían variar durante la estación polínica. Así, publican un trabajo en el que evalúan el papel del TAB antes (pacientes asintomáticos) y durante la estación polínica (pacientes sintomáticos) en un grupo de 13 pacientes monosensibilizados a polen de gramíneas (prueba cutánea a una batería de neumalérgenos más prevalentes en su área del estudio solo positiva a polen de gramíneas). Los basófilos

no mostraron una activación espontánea durante la estación polínica de gramíneas ya que la expresión de CD63 se encontraba por debajo de los niveles detectables antes de la activación celular *in vitro*. Así mismo, se observó un descenso en el pico máximo de basófilos activados tras estimulación alérgeno-específica durante la época polínica en comparación con los datos obtenidos antes de dicha estación, aunque todos los pacientes tuvieron un TAB positivo. Por tanto, estos autores concluyen que el TAB también es una herramienta útil en el diagnóstico de pacientes polínicos durante la exposición natural al alérgeno, aunque si el objetivo del empleo de la técnica es la activación cuantitativa del basófilo, el momento en que se realiza el test es crítico, ya que pueden observarse diferencias si se realiza durante o fuera de la estación polínica (Saporta M, 2001).

Por otro lado, se ha analizado la activación *in vitro* del basófilo mediante citometría de flujo utilizando alérgenos recombinantes y el CD203c como marcador de activación alternativo para el diagnóstico de sensibilización *in vitro* a pólenes (Cozon G, 1999) y veneno de himenópteros (Binder M, 2002) confirmando ser muy fiable y útil también en estos casos. Además, el TAB ha demostrado constituir una herramienta valiosa para comparar la alergenidad de extractos de alérgenos naturales y alérgenos químicamente modificados y recombinantes (Kahlert H, 2003).

La fiabilidad del diagnóstico *in vitro* de la alergia al látex mediante el TAB también ha sido estudiada, así como su correlación con otros métodos de diagnóstico *in vitro* para dicho alérgeno (Ebo DG, 2002; Sanz ML, 2003). En el trabajo publicado por el grupo de Sanz ML, se incluyeron 43 pacientes con alergia al látex demostrada (historia clínica y prueba cutánea positivas) comparado con un grupo control (historia clínica, prueba cutánea e IgE sérica específica negativas). El TAB obtuvo una sensibilidad y especificidad elevadas (93% y 100% respectivamente) y mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con la determinación sérica de IgE específica, el test de liberación de histamina y la producción específica de sulfidoleucotrienos.

#### **6.4.2 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a medicamentos**

Se ha propuesto el TAB como un método diagnóstico útil para la evaluación de las reacciones mediadas por IgE a diferentes fármacos como los antibióticos betalactámicos (Sanz, 2002; Torres MJ, 2004; Torres MJ, 2010), quinolonas (Aranda A, 2011; Ben SB, 2010; Manfredi M, 2004; Mayorga C, 2012), antiinflamatorios no esteroideos (Ariza A, 2014; Celik G, 2009; De Weck AL, 2009; Gamboa P, 2004; Rodríguez-Trabado A, 2008; Sanz ML, 2005), corticoides (Aranda, 2010; Ben Said B, 2010; Torres MJ, 2010), y relajantes musculares (Monneret G, 2002).

La activación de los basófilos no mediada por receptores de IgE da lugar a la liberación de histamina, pero sin secreción de citoquinas. Puede ser producida por distintos factores, endógenos y exógenos, entre los que se encuentran los AINEs (Kleine-Tebbe J, 2006). Debido a la capacidad de estos fármacos para producir la activación de los basófilos, esta técnica se ha intentado aplicar en el diagnóstico de la hipersensibilidad a AINEs en pacientes con reacciones de tipo cutáneo y/o respiratoria, aunque de acuerdo con los datos obtenidos en diversos estudios al respecto (Celik G, 2009; De Weck AL, 2009; Gamboa P, 2004; Mayorga C, 2012; Rodríguez-Trabado A, 2008; Sanz ML, 2005), en la actualidad el TAB no se considera un método útil para el diagnóstico de las reacciones de intolerancia cruzada a AINEs, ya que carece de una sensibilidad y especificidad óptimas, dando lugar a un número importante de falsos negativos y de falsos positivos.

El TAB como método diagnóstico de pacientes con alergia a antibióticos betalactámicos, ha demostrado una sensibilidad del 48,6% y una especificidad del 93% (Sanz, 2002; Torres MJ, 2004). Se ha observado que la sensibilidad de este ensayo es mayor cuando se emplean como reactivos haptenos sin conjugar previamente a una molécula portadora (Torres MJ, 2004), aunque todavía no se conoce bien el mecanismo por el que estos haptenos interaccionan con las moléculas de IgE específica unidas a la superficie de los basófilos para desencadenar su activación.

Una de las ventajas fundamentales del TAB reside en la posibilidad de su utilización para la evaluación de reacciones a fármacos que no tienen posibilidad de ser evaluados por otras técnicas *in vivo* e *in vitro* como es el caso de las fluoroquinolonas. Estos fármacos son probablemente los antibióticos no-betalactámicos más frecuentemente implicados en las reacciones alérgicas a medicamentos (Doña I, 2012). El TAB ha demostrado recientemente ser una herramienta útil en el diagnóstico *in vitro* de las reacciones de hipersensibilidad inmediata a fluorquinolonas, aunque la sensibilidad no es óptima (Aranda A, 2011; Ben SB, 2010; Manfredi M, 2004, Mayorga C, 2013). Otros fármacos importantes son los medios de contraste radiológico (MCR) (Brockow K, 2005). Originariamente, el mecanismo de hipersensibilidad a MCR propuesto fue la liberación no específica de mediadores de los mastocitos (Laroche D, 1998). El TAB ha sido considerado herramienta útil en su diagnóstico (Dewachter P, 2009; Pinnobphun P, 2011). En un estudio muy reciente (M. Salas, 2013) en el que se reclutó un grupo de 90 pacientes estudiados en el periodo 2006-2011 con historia sugestiva de hipersensibilidad a MCR, se confirmó alergia a MCR en menos del 10% de los casos, el 62,5% mediante test cutáneo y el 37,5% mediante test de provocación. Se realizó estudio *in vitro* mediante TAB con iohexol, iodixanol, iomeprol e ioxaglate, siendo positivo en el 62,5% de los casos con diagnóstico de hipersensibilidad confirmado, mostrando este método una buena correlación con los resultados en prueba cutánea y test de provocación, indicando que el TAB podría ser una herramienta útil para confirmar el diagnóstico, especialmente en casos graves.

#### **6.4.3 El TAB en el diagnóstico de la sensibilización a veneno de himenópteros**

Alérgenos potentes como lo presentes en el veneno de himenópteros son capaces de inducir reacciones severas, y en ocasiones, potencialmente mortales. Para su diagnóstico, se ha evaluado el papel del TAB comparando los resultados obtenidos con la historia clínica, test cutáneos, la determinación de IgE específica en suero y otros test celulares *in vitro*, como la liberación de histamina mediante radioinmunoensayo y la liberación de LT-C4 mediante ELISA, mostrando el TAB una

alta sensibilidad y especificidad y una buena correlación con éstas últimas y la historia clínica (Sainte-Laudy J,2000). Sin embargo, los estudios publicados muestran que el TAB no tiene una buena correlación con los niveles de IgE específica (prueba cutánea y CAP) para el diagnóstico de la alergia a veneno de himenópteros (Sainte-Laudy J, 2000; Santos MC, 2002).





## JUSTIFICACIÓN

La rinitis constituye un problema importante de salud a nivel mundial, afectando al 20-40% de los sujetos de los países occidentales, tanto población adulta como pediátrica. En la práctica clínica es difícil distinguir entre rinitis alérgica (RA) y rinitis no alérgica (RNA) y en consecuencia esto impide un abordaje terapéutico eficaz. En este sentido, publicaciones recientes han demostrado, tras un estudio alergológico completo, que dentro del grupo de RNA existe un porcentaje significativo de pacientes que realmente presentan rinitis alérgica. Dichas publicaciones confirman que la RAL es un problema frecuente, afectando al 25.7% del total de casos de rinitis evaluados en un año en nuestro medio (aproximadamente 1 de cada 4 pacientes), lo cual implica que sin una evaluación correcta, gran número de pacientes podrían ser erróneamente diagnosticados y por tanto no tratados.

La RAL se caracteriza, al igual que la RA, por una respuesta positiva al test de provocación nasal (TPN), con una liberación local de mediadores inflamatorios, un patrón inflamatorio nasal Th2, en ausencia de atopia sistémica. Pero a diferencia de la RA, los sujetos con RAL no muestran una respuesta positiva a los tests convencionales de atopia sistémica (pruebas cutáneas e IgE sérica específica negativos). Por ello, el diagnóstico se basa exclusivamente en una respuesta positiva al TPN y/o demostración de producción local de IgE específica para alérgeno.

Si bien el TPN ha demostrado ser una herramienta clave para diagnosticar pacientes con RAL, con una alta sensibilidad y especificidad y muy reproducible, es una técnica que no está disponible en todos los centros, necesita de personal entrenado para su realización y consume mucho tiempo y recursos. Comparativamente, la determinación nasal de IgE específica tiene ventajas, ya que es una técnica no invasiva y con una elevada especificidad. Sin embargo, presenta una muy baja sensibilidad (22%) tal y como se ha demostrado en lavados nasales de pacientes alérgicos a ácaros.

Los basófilos periféricos son células clave en la respuesta alérgica inmediata mediada por IgE. A lo largo de los años diversos estudios han evaluado la presencia de los basófilos activados y su respuesta a los alérgenos. Así, el test de activación de

basófilos (TAB) es hoy día una técnica validada para el diagnóstico *in vitro* de sensibilización a diversos aeroalérgenos, veneno de himenópteros y algunos medicamentos. Es un test reproducible con una sensibilidad y especificidad elevadas para algunos alérgenos. Sin embargo, el uso potencial del TAB en la evaluación de pacientes con RAL no ha sido investigado. En el caso de los sujetos RAL, no se conoce si los basófilos a nivel sistémico tienen o no una respuesta específica puesto que en este tipo de rinitis la respuesta alérgica se restringe al nivel local. En el presente estudio se plantea evaluar la presencia de activación específica con alérgenos de los basófilos mediante el TAB en un grupo de pacientes con RAL confirmada mediante TPN, comparado con un grupo de pacientes con RA clásica utilizando como grupos control sujetos con RNA y sujetos sanos (pruebas cutáneas, IgE específica sérica y TPN negativas para ambos grupos).

Entre los aeroalérgenos responsables de RA más frecuentes en nuestro medio, los ácaros del polvo doméstico y los pólenes constituyen dos de las principales fuentes alérgicas, junto con los hongos y epitelios de animales. Dentro del grupo de los ácaros, el género *Dermatophagoides* es el más prevalente en nuestro área siendo la especie *pteronyssinus* la que se sitúa a la cabeza. Más del 80% de los pacientes con alergia respiratoria por ácaros posee IgE específica para Der p1, proteína con función cisteín-proteasa y alérgeno mayoritario de dicha especie.

Las familias de plantas cuyos pólenes son alergénicos son las gramíneas, los árboles y las malezas, siendo en las costas mediterráneas el olivo uno de los pólenes más prevalentes. El polen de olivo constituye una mezcla compleja y heterogénea de alérgenos, destacando entre ellos el Ole e1, proteína glicosilada que se comporta como epítipo alergénico en aproximadamente el 62% de los pacientes, por lo que es considerado el alérgeno mayoritario del polen del olivo.

En pacientes con RA clásica, se ha demostrado una respuesta específica de la mucosa nasal a alérgenos mayoritarios purificados; sin embargo, no existen por el momento estudios dirigidos a evaluar esta misma respuesta en sujetos con RAL.

Por ello, será de gran interés evaluar el papel del TAB en el diagnóstico de pacientes con RAL, utilizando como modelos el alérgeno perenne más frecuente en nuestro medio (*Dermatophagoides pteronyssinus*), y además un alérgeno estacional como el polen del olivo (*Olea europea*). Así mismo, evaluaremos la respuesta utilizando alérgenos moleculares, específicamente el alérgeno nOle e1. Se analizará la sensibilidad, especificidad y concordancia que presenta esta técnica con respecto al TPN para poder establecer su papel en el diagnóstico de los pacientes con RAL.





## OBJETIVOS

1. Evaluar los niveles de activación alérgeno-específica de basófilos mediante la técnica de test de activación de basófilos (TAB) en sujetos con rinitis alérgica local producida por *D. Pteronyssinus* y sin evidencia de atopia sistémica evaluada por métodos convencionales (pruebas cutáneas e IgE específica sérica).
2. Comparar la activación alérgeno-específica de basófilos en sujetos con rinitis alérgica local, sujetos con rinitis alérgica clásica, rinitis no alérgica y controles sanos no atópicos.
3. Demostrar la especificidad de la respuesta y el mecanismo IgE mediado de la activación alérgeno-específica de basófilos en sujetos con rinitis alérgica local producida por *D. Pteronyssinus*.
4. Evaluar la presencia de activación alérgeno-específica de basófilos mediante TAB en una amplia población de sujetos con rinitis alérgica local y sistémica a *D.Pteronyssinus*.
5. Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y correlación del TAB con el TPN en sujetos con rinitis alérgica local y rinitis alérgica sistémica producida por *D. Pteronyssinus*.
6. Evaluar la presencia de activación alérgeno-específica de basófilos mediante TAB en sujetos con rinitis alérgica local producida por pólenes (polen de olivo).
7. Evaluar las respuestas *in vivo* a un alérgeno mayoritario purificado prevalente en nuestro medio, utilizando como alérgeno modelo Ole e1 nativo (nOle e 1) en pacientes con RAL por olivo confirmada mediante TPN y compararla con la producida con extracto completo de olivo.
8. Evaluar las respuestas *in vitro* mediante TAB a nOle e 1 en pacientes con RAL por olivo confirmada mediante TPN y compararla con la producida con el extracto completo de olivo.







## ARTÍCULOS

La presente memoria de tesis doctoral se compone de los siguientes artículos:

**Artículo 1:** Gómez E, Campo P, Rondón C, **Barrionuevo E**, Blanca-López N, Torres MJ, Herrera R, Galindo L, Mayorga C, Blanca M. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2013 Oct;132(4):975-6.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.016. Epub 2013 Aug 31.

**Artículo 2:** Paloma Campo; Carmen Rondón; **Esther Barrionuevo**; Enrique Gómez; María José Torres; Luisa Galindo; Natalia Blanca-López; Cristobalina Mayorga; Miguel Blanca. Basophil activation test supports the diagnosis of local allergic rhinitis caused by *D. Pteronyssinus*. (en revisión).

**Artículo 3:** Paloma Campo; Mayte Villalba; **Esther Barrionuevo**; Carmen Rondón; Luisa Galindo; María José Sánchez-Quintero; Juan Carlos López-Rodríguez; María José Torres; Miguel Blanca; Cristobalina Mayorga. *In vivo* and *in vitro* responses to native Ole e1 (*nOle e1*) in systemic and local allergic rhinitis. (en revisión).



Artículo 1: Gómez E, Campo P, Rondón C, **Barrionuevo E**, Blanca-López N, Torres MJ, Herrera R, Galindo L, Mayorga C, Blanca M. Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2013 Oct;132(4):975-6.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.016. Epub 2013 Aug 31.



# Role of the basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis

To the Editor:

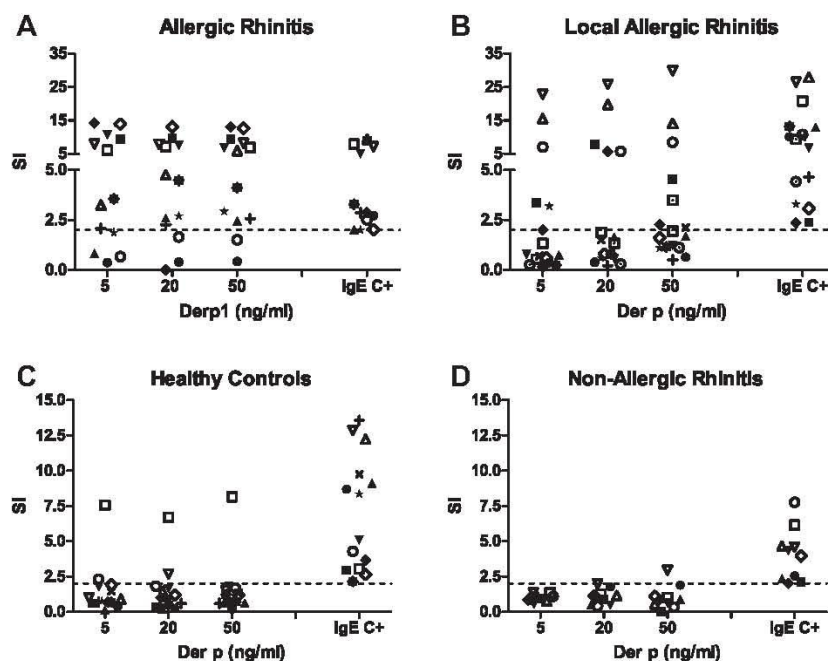
In clinical practice, distinguishing between allergic rhinitis (AR) and nonallergic rhinitis (NAR) can be difficult.<sup>1</sup> Recent publications have demonstrated that a significant number of patients previously given a diagnosis of NAR have local allergic rhinitis (LAR) or “entopy,”<sup>2-4</sup> with an estimated prevalence of 25.7% of all cases of rhinitis evaluated in a 1-year period in our department.<sup>5</sup> LAR is characterized by a positive response to the specific nasal provocation test (NPT) with allergens, with a  $T_H2$  response in the absence of systemic atopy (negative skin test/serum specific IgE).<sup>2</sup> The NPT is a key tool for diagnosis of LAR. This test has high sensitivity and specificity and is very reproducible, although it requires well-trained personnel and is time consuming. Measurement of local specific IgE levels is noninvasive and very specific, but the sensitivity is rather low.<sup>2</sup> Therefore without the correct diagnostic approach, a large number of patients with LAR can receive a misdiagnosis.

Peripheral basophils are key cells in the allergic response and are involved in immediate IgE-mediated allergic reactions. The basophil activation test (BAT) is a validated technique for *in vitro* diagnosis of sensitization to inhalant and food allergens, Hymenoptera venom, and several drugs.<sup>6</sup> The aim of this study was to evaluate the presence of specific allergen activation of basophils by using the BAT in a group of patients with confirmed LAR caused by *Dermatophagoides pteronyssinus*.

BATs with 5, 20, and 50 ng/mL of *D pteronyssinus* extract were performed in 55 subjects: 16 with LAR (positive NPT

with *D pteronyssinus*, negative skin test, and specific IgE to *D pteronyssinus*), 14 with AR (positive NPT with *D pteronyssinus*, positive skin test, and specific IgE to *D pteronyssinus*), 10 with NAR (negative NPT, skin test, and specific IgE to *D pteronyssinus*, *Alternaria*, *Phleum*, and olive tree pollen), and 15 healthy control subjects (negative NPT, skin test, and specific IgE to *D pteronyssinus*). BATs with wortmannin pretreatment were performed in 4 patients with LAR to demonstrate a specific IgE mechanism of basophil activation (for more information, see the [Methods](#) section in this article’s Online Repository at [www.jacionline.org](#)).

The clinical characteristics of all patients are shown in [Table E1](#) in this article’s Online Repository at [www.jacionline.org](#). The results of BAT with *D pteronyssinus* are summarized in [Fig 1](#). One patient with AR and 1 healthy control subject were not included in the analysis because of negative results with the anti-IgE-positive control and allergen (nonresponders). BAT results with *D pteronyssinus* were positive in 11 (85%) of 13 patients with AR ([Fig 1, A](#)). In patients with LAR, 8 (50%) of 16 had a positive BAT result with *D pteronyssinus* ([Fig 1, B](#)). One (7%) of 14 healthy control subjects had a positive result ([Fig 1, C](#)), and 1 (10%) of 10 patients with NAR had positive results ([Fig 1, D](#)). BAT sensitivity was 85% in patients with AR and 50% in patients with LAR, with a specificity of 93% for both groups. Positive predictive value for the AR group was 0.92, and that for the LAR group was 0.89. Negative predictive value was 0.87 for the AR group and 0.62 for the LAR group. The analysis of concordance<sup>7</sup> of BAT results with NPT results revealed a substantial concordance in the AR group ( $\kappa$  index = 0.78,  $P = .0001$ ; results are summarized in [Table I](#)). The specific IgE mechanism of basophil activation was demonstrated by



**FIG 1.** BAT after adding *D pteronyssinus* at 5, 20, and 50 ng/mL. The horizontal line indicates the cutoff point of the assay. *Der p*, *D pteronyssinus*; *IgE C+*, positive IgE control; *SI*, stimulation index. **A**, Patients with AR ( $n = 13$ ). **B**, Patients with LAR ( $n = 16$ ). **C**, Healthy control subjects ( $n = 14$ ). **D**, Patients with NAR ( $n = 10$ ).



**TABLE I.** Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of BATs with *D pteronyssinus* in the AR and LAR groups

	Positive BAT result (%)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	$\kappa$ Index
AR (n = 14)*	11/13 (85%)	85%	93%	92%	87%	0.78†
LAR (n = 16)	8/16 (50%)	50%	93%	89%	62%	NA
CG (n = 15)*	1/14 (7%)	NA	NA	NA	NA	NA
NAR (n = 10)	1/10 (10%)	NA	NA	NA	NA	NA

CG, Control group; NA, not applicable; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

\*One subject from the AR group and 1 subject from the healthy control group were excluded from the analysis (nonresponders in the BAT assay).

† $P = .0001$ .

performing BATs with wortmannin pretreatment in 4 randomly selected patients with LAR, showing negativization of results with the IgE-mediated positive control and persistence of positivity with N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) (non-IgE-mediated positive control). Also, positive responses to *D pteronyssinus* became negative in all patients with LAR when wortmannin was added to the assay (see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

Since the first study of Huggins and Brostoff,<sup>8</sup> several investigators have reported local production of IgE antibodies in patients with NAR.<sup>2,3</sup> Others have shown that a percentage of patients with NAR respond to NPTs with allergens, being defined as having "local allergic rhinitis" or "entopy."<sup>2-4</sup> The current investigation represents the first evidence of detection of specific basophil activation in peripheral blood in patients with LAR who did not have positive responses to conventional tests, such as skin testing and serum specific IgE measurement. Our results show that at least 50% of the patients with LAR to *D pteronyssinus* can receive a correct diagnosis by using this approach in contrast with the low sensitivity of other determinations, such as measurement of specific IgE levels in nasal lavage fluid (22% of positive responses to *D pteronyssinus*),<sup>2</sup> and it is less time-consuming than the NPT. Moreover, BAT wortmannin assays demonstrated that the activation of basophils in these patients was IgE mediated. In a recent review Dullaers et al<sup>9</sup> stated that the mucosa might be the primary site of allergen-specific IgE production and suggested that some nonatopic subjects are in fact atopic but that there is a lack of spillover of the mucosally produced allergen-specific IgE into the circulation. In our study we detected allergen-specific IgE on the surfaces of peripheral basophils of patients with LAR, suggesting that after local production of specific IgE, basophils might be the first or only target cells for specific IgE before the detection of free serum specific IgE and skin mast cell sensitization. It is possible that BAT might be a useful tool for supporting the diagnosis of LAR.

In conclusion, BAT was able to diagnose at least 50% of cases of LAR to *D pteronyssinus* and was more sensitive than detection of nasal specific IgE and less time-consuming than NPTs. IgE-specific activation of basophils was demonstrated by using BAT wortmannin assays. The allergen concentration range for proper basophil stimulation in patients with LAR has to be defined because the low amount of specific IgE in these patients might require the use of higher doses of allergen stimulation to achieve better sensitivity. Although this pilot study is promising, future studies with larger populations and replication of these

results with other allergens are needed to fully assess the diagnostic performance of BAT in patients with LAR.

We thank Ian Johnstone for his help with the final English version of this manuscript and Lidia Meléndez and Jose Rodríguez-Bada for technical support.

Enrique Gómez, PhD<sup>a,\*</sup>  
Paloma Campo, MD, PhD<sup>b,\*</sup>  
Carmen Rondón, MD, PhD<sup>b</sup>  
Esther Barrionuevo, MD<sup>b</sup>  
Natalia Blanca-López, MD, PhD<sup>b</sup>  
María José Torres, MD, PhD<sup>b</sup>  
Rocío Herrera, RN<sup>b</sup>  
Luisa Galindo, RN<sup>b</sup>  
Cristobalina Mayorga, PhD<sup>a,†</sup>  
Miguel Blanca MD, PhD<sup>b,†</sup>

From <sup>a</sup>the Allergy Research Laboratory and <sup>b</sup>U.G.C. Allergy, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain; and <sup>c</sup>the Allergy Service, Infanta Leonor Hospital, Madrid, Spain. E-mail: [campomozo@yahoo.com](mailto:campomozo@yahoo.com).

\*†These authors contributed equally to this work.

Supported by grants from the Spanish Health Ministry Fund for Health in Spain (FIS) network RIRAAF (RD07/0064), PI11/02619, PI12/00900 and the Andalusian Health Ministry (PI0542-2010).

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## REFERENCES

- Molgaard E, Thomsen SF, Lund T, Pedersen L, Nolte H, Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. *Allergy* 2007;62:1033-7.
- Rondón C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, et al. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology and management. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1460-7.
- Powe DG, Jagger C, Kleinjan A, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. "Entopy": localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1374-9.
- Powe DG, Bonnin AJ, Jones NS. "Entopy": local allergy paradigm. *Clin Exp Allergy* 2010;40:987-97.
- Rondón C, Campo P, Galindo L, Blanca-López N, Cassinello MS, Rodríguez-Bada JL, et al. Prevalence and clinical relevance of local allergic rhinitis. *Allergy* 2012;67:1282-8.
- Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:79-90.
- Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
- Huggins KG, Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet* 1975;2:148-50.
- Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Geavert P, Lambrecht BN. The who, where and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:635-45.

Available online September 5, 2013.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.016>



## METHODS

## Study subjects

The study included 55 patients: 16 patients with LAR, 14 patients with AR, 10 patients with NAR, and 15 healthy control subjects recruited from the Allergy Departments in Carlos Haya Hospital and Infanta Leonor Hospital. The study was performed from July through September 2011, when the patients were symptom free and without treatment.

**LAR inclusion criteria.** These included a history of persistent LAR to *D pteronyssinus* for at least 2 years, a positive NPT with *D pteronyssinus*, a negative skin test to *D pteronyssinus* (intradermal test/skin prick test [SPT]), and negative serum specific IgE levels to *D pteronyssinus* and a battery of common aeroallergens.

**AR inclusion criteria.** These included a history of persistent AR to *D pteronyssinus* for at least 2 years, a positive NPT with *D pteronyssinus*, a positive SPT and serum specific IgE to *D pteronyssinus*.

**NAR inclusion criteria.** These included a history of persistent symptoms of rhinitis for at least 2 years; a negative NPT with *D pteronyssinus*, *Alternaria* grass, and olive tree pollen using a multiple-allergen NPT<sup>B1</sup>; a negative skin test to *D pteronyssinus*; and a battery of common aeroallergens (intradermal test/SPT), and negative serum specific IgE levels to *D pteronyssinus* and a battery of common aeroallergens.

**Healthy control subject inclusion criteria.** The control subjects had no allergic or nasal diseases and negative SPT/intradermal test negative serum specific IgE levels to aeroallergens, and negative NPT with *D pteronyssinus*.

**Exclusion criteria.** Exclusion criteria includes patients with chronic rhinosinusitis evaluated by means of a computed tomographic scan; patients with massive polyposis, septal perforation, total nasal blockage, upper respiratory tract infection, or any other condition that does not allow performance of a nasal challenge; pregnant or breast-feeding patients; patients who had autoimmune and/or any other severe disease that contraindicated NPT and patients with psychosomatic disorders or who were unable to follow the instructions.

The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committees. All participants and parents of patients less than 16 years old were informed and signed the corresponding informed consent form.

## Skin testing

SPTs were performed with a panel of the most prevalent aeroallergens, including *D pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Phleum*, *Lolium*, *Cupressus*, *Platanus*, *Olea europaea*, *Chenopodium*, *Artemisia*, *Parietaria*, *Salsola kali*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and dog and cat epithelia (ALK-Abelló, Madrid, Spain).<sup>B2</sup> Intradermal skin tests were performed with freshly reconstituted freeze-dried allergen with *D pteronyssinus* (0.4 µg/mL, ALK-Abelló), as previously described.<sup>B3</sup>

## Total and specific IgE measurement

Serum total and specific IgE measurement to the same aeroallergens in the SPT panel were done with the fluoroenzyme immunosorbent assay (UniCAP; Thermo Fisher, Waltham, Mass). The positive cutoff value of the specific IgE was greater than 0.35 kU/L.

NPT with *D pteronyssinus*

NPTs with *D pteronyssinus* were performed according to previously described methods.<sup>B1</sup> Subjects had to stop taking leukotriene modifiers, antihistamines, nasal corticosteroids 1 week before the study, and systemic corticosteroids 4 weeks before the study. Nasal hyperresponsiveness was ruled out by performing a nasal challenge with 0.9% saline before applying the allergen in the nose. NPTs were performed by applying 2 puffs (100 µL) of freshly reconstituted *D pteronyssinus* extract (Der p 1, 4 µg/mL; ALK-Abelló) through a metered pump. Responses were monitored based on results of

acoustic rhinometry (SRE 2000 rhinometer; Rhinometrics, Lynge, Denmark) and symptom scores. Acoustic rhinometry was performed according to the guidelines of the Standardization Committee on Acoustic Rhinometry,<sup>B4</sup> measuring the volume of the nasal cavity that corresponds to the lower turbinate (volume, 2–6 cm) in each nostril. Nasal obstruction, rhinorrhea, itching, sneezing, and ocular symptoms were recorded by using a visual analog scale (VAS) of 100 mm. The total VAS score was the sum of the 5 VAS scores (total range, 0–500 mm). NPTs were performed in symptom-free patients (total VAS, <60 mm).<sup>B1</sup> A positive NPT result was considered an increase of 30% or greater in total nasal symptoms and a decrease of 30% or greater in total volume of 2 to 6 cm of both nasal cavities compared with the baseline test.

BAT with *D pteronyssinus*

One hundred microliters of heparinized whole blood was placed in aliquots per test, and 20 µL of stimulation buffer was added and incubated for 10 minutes with agitation at 37°C in a water bath. After this, 100 µL of the washing solution was added to the negative control tube, 100 µL of anti-human IgE antibodies (BD PharMingen, San Diego, Calif) was added to the positive control tubes, and 100 µL of the allergen (*D pteronyssinus* extract, ALK-Abelló) was added at final concentrations of 5, 20, and 50 ng/mL. These concentrations were chosen based on a dose-response curve (Fig E2). The samples were incubated for 30 minutes at 37°C during agitation. The degranulation was stopped by incubating the samples on ice for 5 minutes, and then 5 µL of the mAbs anti-IgE fluorescein isothiocyanate and CD63 phycoerythrin (Caltag Laboratories, Burlingame, Calif) was added to each tube to characterize basophils and activation, respectively. After 20 minutes at 4°C in the dark, 2 mL of prewarmed lysing solution was added and centrifuged for 5 minutes at 4°C. Cells were washed and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, BD Bioscience) by acquiring at least 500 basophils per sample. Results were considered positive when the stimulation index, which was calculated as the ratio between the percentage of degranulated basophils with *D pteronyssinus* and the negative control, was 2 or greater in at least 1 of the allergen concentrations mentioned above. This value was selected after the performance of a receiver operating characteristic curve comparing BAT results between patients and control subjects because this value allows adequate sensitivity and specificity for both patients with LAR and those with AR (data not shown). When the percentage of spontaneously activated basophils was less than 2.5%, we required an additional condition (ie, that the percentage of basophils activated after contact with the antigen should be ≥5%), as previously described.<sup>B5</sup> Nonresponder patients, who are considered those with negative results to the anti-IgE-positive control and allergen, were not included in the study.

BAT performed with *D pteronyssinus* and wortmannin

To demonstrate a specific IgE mechanism of activation in basophils, BATs with wortmannin pretreatment (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo) were performed in 4 randomly selected patients with LAR among those with a previous positive BAT response to *D pteronyssinus*. Wortmannin is an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase that participates in the signal transduction pathway responsible for histamine secretion after stimulation of FcεRI,<sup>B6</sup> and therefore activation should be blocked with pretreatment. In these experiments, samples are pretreated with wortmannin for 5 minutes in agitation at 37°C. As a positive control and because of the features of the inhibitor, N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine was also included in the test. After this step, samples were processed following the protocol described above for a classic BAT.

## Statistical analysis

Data were expressed as medians and ranges. The clinical and demographic data were compared between groups by using  $\chi^2$  analysis and the Mann-Whitney *U* test. The Friedman test was used to examine the overall differences. If significant differences occurred, the Wilcoxon signed-rank test was used to identify them within groups. Correlation between NPTs

and BATs was obtained by calculating the  $\kappa$  index, as previously described.<sup>E7</sup> All *P* values of less than .05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Subjects' characteristics

A total of 55 subjects were included in the study, and the characteristics of these patients have been summarized in Table E1. In the AR, LAR, and NAR groups, all subjects had perennial rhinitis symptoms for at least 2 years (AR group, 6.4 years [2-35 years]; LAR group, 5.5 years [2-50 years]; NAR group, 5.8 years [2-48 years]; *P* = not significant). Asthma symptoms were present in 38% of patients with AR, 33% of patients with LAR, and 35% of patients with NAR. Also, 77% of patients with AR, 88% of patients with LAR, and 79% of patients with NAR had conjunctivitis. Total IgE levels were significantly higher in patients with AR than in patients with LAR, patients with NAR, and control subjects (AR group, 247 IU/mL [53-4010 IU/mL]; LAR group, 21 IU/mL [4-131 IU/mL]; healthy control group, 23 IU/mL [4-213 IU/mL], and NAR group, 25 IU/mL [4-248 IU/mL]; *P* < .05). All patients with AR had positive skin test and specific IgE levels to *D pteronyssinus*, and results were negative in patients with LAR, patients with NAR, and control subjects. NPT results with *D pteronyssinus* were positive in all patients with AR and those with LAR and negative in both control groups. All patients with LAR, patients with NAR, and control subjects had negative skin test and specific IgE levels to all allergens tested, including *D pteronyssinus*.

### Dose-response curve for BATs

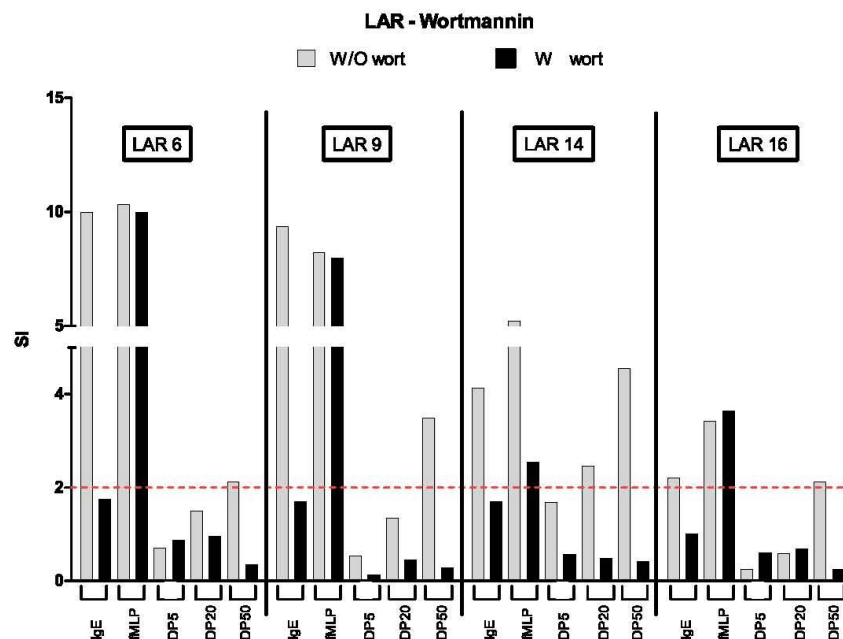
For performing the BAT, *D pteronyssinus* was added to basophils of all 55 participants at final concentrations of 5, 20,

and 50 ng/mL. These concentrations were chosen based on a dose-response curve, in which sequential dilutions of *D pteronyssinus* were incubated with basophils of positive subjects (6 patients with AR) and healthy control subjects. As shown in Fig E2, *D pteronyssinus* concentrations of 400 ng/mL or less did not induce activation of basophils in control subjects. Concentrations of *D pteronyssinus* of greater than 50 ng/mL (100, 200, and 400 ng/mL) did not produce any significant increase in stimulation index values in subjects with positive results compared with the 50 ng/mL concentration.

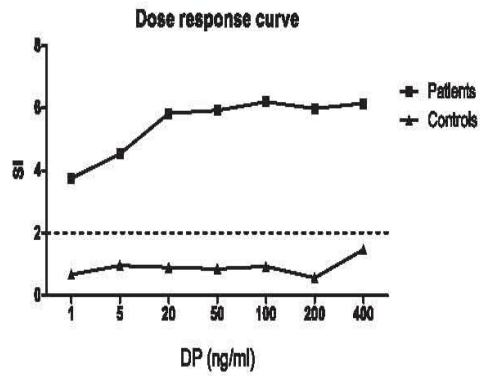
## REFERENCES

- E1. Rondón C, Campo P, Herrera R, Blanca-López N, Meléndez L, Canto G, et al. Nasal allergen provocation test with multiple aeroallergens detects polysensitization in local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:1192-7.
- E2. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012;67:18-24.
- E3. López S, Rondón C, Torres MJ, Campo P, Canto G, Fernandez R, et al. Immediate and dual response to nasal challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in local allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1007-14.
- E4. Hilberg O, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recommendations for technical specifications and standard operating procedures [published erratum in *Rhinology* 2001;39:119]. *Rhinol Suppl* 2000;16:3-17.
- E5. Gómez E, Blanca-López N, Torres MJ, Requena G, Rondón C, Canto G, et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1217-24.
- E6. Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, et al. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 1993;268:25846-56.
- E7. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.





**FIG E1.** BATs performed in 4 patients with LAR by using both the standard assay (gray bars) and wortmannin pretreatment (full bars). Results are plotted side by side for each dilution. The horizontal line indicates the cutoff point of the assay. DP, *D pteronyssinus*; fMLP, N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine; SI, stimulation index.



**FIG E2.** BAT dose-response curves with serial dilutions of *D. pteronyssinus* (DP) extract (1-400 ng/mL) in 6 patients with AR and 6 control subjects. Results are expressed as the stimulation index (SI).

**TABLE E1.** Clinical characteristics of patients with AR, patients with LAR, patients with NAR, and healthy control subjects

	Age (y), median (range)	Sex (F/M)	Diagnosis of rhinitis (y), median (range)	Presence of asthma symptoms (%)	Presence of conjunctivitis (%)	Total IgE (IU/mL), median (range)	Specific IgE (kU/L), median (range)	Positive SPT/ID, result with DP (%)	Positive NPT result with DP (%)
AR (n = 13)	33 (16-62)	7/6	6.4 (2-35)	38%	77%	247 (53-4010)*	12.6 (1.9-95.9)*	100%*	100%
LAR (n = 16)	33.5 (15-58)	12/4	5.5 (2-50)	33%	88%	21 (4-131)	<0.35	0%	100%
CG (n = 14)	36 (26-50)	12/2	NA	NA	NA	23 (4-213)	<0.35	0%	0%
NAR (n = 10)	34.2 (17-60)	8/2	5.8 (2-48)	35%	79%	25 (4-248)	<0.35	0%	0%

DP, *D. pteronyssinus*; F, female; CG, healthy control group; ID, intradermal test; M, male; NA, not applicable.

\* $P < .05$ .



**Artículo 2:** Paloma Campo; Carmen Rondón; **Esther Barrionuevo**; Enrique Gómez; María José Torres; Luisa Galindo; Natalia Blanca-López; Cristobalina Mayorga; Miguel Blanca. Basophil activation test supports the diagnosis of local allergic rhinitis caused by *D. Pteronyssinus*. **(en revisión)**.





**Title:** Basophil activation test supports the diagnosis of local allergic rhinitis caused by *D. Pteronyssinus*

**Short title:** Basophil activation test for diagnosis of local allergic rhinitis

**Authors' list:** Paloma Campo, MD, PhD.<sup>1</sup>, Carmen Rondón, MD, PhD.<sup>1</sup>, Esther Barrionuevo, MD<sup>1</sup>, Enrique Gómez, PhD.<sup>2</sup>, María José Torres MD, PhD.<sup>1</sup>, Luisa Galindo, R.N.<sup>1</sup>, Natalia Blanca-López, MD, PhD.<sup>3</sup>, Cristobalina Mayorga, PhD.<sup>2\*</sup>, Miguel Blanca MD, PhD<sup>1\*</sup>

**Departmental and Institutional Affiliations:**

<sup>1</sup>U.G.C. Allergy, Carlos Haya Hospital, Málaga, Spain

<sup>2</sup>Allergy Research Laboratory, Carlos Haya Hospital, Málaga, Spain

<sup>3</sup>Allergy Service, Infanta Leonor Hospital, Madrid, Spain

\*Both authors contributed equally to this manuscript

**Corresponding Author:**

Paloma Campo, MD, PhD. UGC Allergy, Carlos Haya Hospital

Plaza Hospital Civil s/n, pabellón 6, 29009 Málaga, Spain

E-mail: campomozo@yahoo.com; Telephone: +34-951-290224 Fax: +34-951-290302

**Word counting:** 2,994 words

**Funding:** This study was supported by grants from the Spanish Health Ministry Fund for Health in Spain (FIS) network RIRAAF (RD07/0064), PI11/02619, PI12/00900 and Andalusian Health Ministry (PI-0542-2010).

## Capsule Summary

Basophil activation test may be a useful tool to support the diagnosis of local allergic rhinitis.

**Keywords:** atopy, basophil activation test, local allergic rhinitis, specific IgE

## Abbreviations

AR: allergic rhinitis

BAT: basophil activation test

CG: control group

DP: Dermatophagoides pteronyssinus

ID: intradermal skin testing

LAR: local allergic rhinitis

NAR: non-allergic rhinitis

NAPT: nasal allergen provocation test

NPV: negative predictive value

PPV: positive predictive value

sIgE: specific IgE

SPT: skin prick testing

## ABSTRACT

### Background:

A recent study demonstrated that 50% of subjects with local allergic rhinitis (LAR) to *D. pteronyssinus* (DP) had a positive basophil activation test (BAT), and that the basophil stimulation was IgE specific.

### Objective:

The aim of this study was to demonstrate whether the results found in our first study were replicated in a larger population of LAR subjects sensitized to DP and confirmed by means of nasal allergen provocation test (NAPT).

### Methods:

BAT was performed in 86 subjects: 32 with confirmed LAR (positive NAPT with DP, negative skin testing and sIgE to DP), 30 with allergic rhinitis (AR)(positive NAPT with DP, positive skin testing and sIgE to DP), 10 non allergic rhinitis subjects (NAR) (negative NAPT and negative skin testing/sIgE to DP, alternaria, olive and grass pollen) and 14 healthy controls (negative NPT, negative skin testing and sIgE to DP).

### Results:

BAT with DP was positive in 90.6% of AR patients and 46.7% of LAR subjects. Positive predictive value was 96.7% and 93.3% for AR and LAR subjects respectively. BAT showed a substantial correlation with NPT in AR subjects (kappa index: 0.8,  $p=0.0001$ ) and fair for LAR subjects.

**Conclusions:** BAT was able to detect close to 50% of LAR subjects to DP with a high specificity and positive predictive value. Data were confirmed in a large group of LAR subjects. Further studies are needed to test this assay with other allergens.

## INTRODUCTION

Local allergic rhinitis (LAR) has been defined as a phenotype of allergic rhinitis (AR) characterized by the presence of a nasal Th<sub>2</sub> allergic inflammatory response, local production of specific IgE (sIgE) antibodies and a positive response to nasal allergen provocation test (NAPT) (1-4). Its prevalence has been estimated in 26% of all subjects affected with rhinitis, with a severity, patterns of nasal symptoms, and presence of comorbidities similar to AR (5). Moreover, the results of the first 5 years of a prospective follow-up study have shown that LAR is an entity well differentiated from AR and that one disease seems not to evolve to the other (6).

For clinicians it is crucial to make an accurate diagnosis of the etiology of the rhinitis (7), since the identification of a responsible aeroallergen allows the establishment of rules of avoidance and the prescription of a specific treatment such as immunotherapy (8). The diagnosis of LAR requires an allergological evaluation of the target organ by specialized diagnostic techniques and trained personnel, and is mainly sustained in two tests: the response to NAPT and/or the detection of local synthesis of sIgE (1,9). The NAPT is considered the gold standard in the diagnosis of both local and systemic AR (1,10) although is not available in many centers, needs well-trained personnel and it is time consuming. Measurement of sIgE in nasal lavage has proved useful for detecting local sensitization, is non-invasive and very specific, but the sensitivity of the test is rather low ranging from 22-35% positive results (9,11), except for alternaria where positive results up to 64% have been reported (12).

Recently, Gomez et al. demonstrated that 50% of subjects with LAR to *D. pteronyssinus* had a positive BAT with high specificity, opening a new line of research and adding a possible aid tool in the diagnosis of LAR (13). Also, authors demonstrated that the basophil stimulation was IgE specific by performing wortmannin pre-treatment in the BAT assay, showing negativization of IgE-mediated positive responses. These findings raised the question whether there is a leaking of sIgE into the circulation from the nasal mucosa, being the peripheral basophils their main target cells prior to the

detection of free serum specific-IgE and skin mast-cells sensitization (14,15). These results have also been found in response to other allergens such as olive tree pollen (16). However, this first report constituted a pilot study performed in a small number of subjects.

The aim of this study was to demonstrate whether the results found in our first study were replicated in a larger population of LAR subjects sensitized to DP and confirmed by means of NAPT.

## MATERIAL AND METHODS

### METHODS

#### *Study subjects*

The study included a total of 86 subjects: 30 with local allergic rhinitis (LAR), 32 with allergic rhinitis (AR), 10 with non-allergic rhinitis (NAR) and 14 healthy controls (CG). Subjects were recruited in Allergy Departments in Hospital Regional de Málaga and Infanta Leonor Hospital. The study was performed in the summer of 2013 when patients were symptom-free and no treatment was required.

*LAR inclusion criteria:* history of persistent LAR to *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP)  $\geq 2$  years, positive nasal provocation test with DP (NPT-DP), negative skin testing to DP (intradermal (ID)/skin prick test (SPT)), and negative serum specific IgE (sIgE) to DP and a battery of common aeroallergens.

*AR inclusion criteria:* history of persistent AR to DP  $\geq 2$  years, positive NAPT-DP, positive SPT and serum sIgE to DP.

*NAR inclusion criteria:* persistent symptoms of rhinitis  $\geq 2$  years, negative NAPT with DP, alternaria, grass and olive tree pollen using a multiple allergen nasal provocation test (17), negative skin testing (ID/SPT) to DP and a battery of common aeroallergens and negative sIgE to DP and a battery of common aeroallergens.

*CG inclusion criteria:* The control subjects had no allergic or nasal diseases, and had negative SPT/ID, negative serum sIgE to aeroallergens and negative NAPT-DP.

*Exclusion criteria:* subjects with chronic rhinosinusitis evaluated by CT-scan; massive polyposis, septal perforation, total nasal blockage, upper respiratory infection or any other condition that does not allow to perform the nasal challenge; pregnant or breastfeeding patients; patients who had autoimmune and/or any other severe disease that contraindicated NPT; subjects with psychosomatic disorders or unable to follow the instructions.

The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committees. All participants and parents of patients

below 16 years old were informed and signed the corresponding informed consent.

### ***Skin testing***

SPTs were performed with a wide panel of prevalent aeroallergens in the area: *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae*, *Phleum*, *Lolium*, *Cupressus*, *Platanus*, *Olea europea*, *Chenopodium*, *Artemisia*, *Parietaria*, *Salsola kali*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, dog and cat epithelia (ALK-Abelló, Madrid, Spain) (18). ID skin test was performed with freshly reconstituted freeze-dried allergen with DP (0.4 µg/ml) (ALK-Abelló) as described (9).

### ***Total and sIgE measurement***

Serum total and sIgE measurement to the same aeroallergens in the SPT panel were determined by fluoroenzyme immunosorbent assay (UNICAP, Thermofisher, USA).

### ***Nasal allergen provocation test with DP (NAPT-DP)***

NAPT with DP was performed according to published methods (9). A nasal challenge with 0.9% was performed prior to the application of the allergen in the nose in order to rule out nasal hyperresponsiveness. Two puffs (100 µL) of freshly reconstituted DP extract (Der p1 4 µg/mL) (ALK-Abelló, Denmark) were applied using a metered pump. Responses were monitored by symptoms' score and acoustic rhinometry (SRE 2000 rhinometer, Rhinometrics, Lynge, Denmark) following the guidelines (19). The volume of the nasal cavity that corresponds to the lower turbinate (vol 2–6 cm) in each nostril was measured at different timepoints. A positive NAPT was considered to be an increase  $\geq 30\%$  in the total nasal symptoms and a decrease  $\geq 30\%$  in the total vol 2–6 cm of both nasal cavities compared with the baseline test.

### ***Basophil activation test with DP***

Hundred microlitres of heparinized whole blood was aliquoted per test and 20 µL of stimulation buffer was added and incubated for 10 minutes with agitation at 37°C in a water bath. After this, 100 µL of the washing solution was added to the negative control tube, 100 µL of anti-human IgE antibodies (BD Pharmingen San Diego, CA, USA) to the positive control tubes and 100 µL of the allergen (D. Pteronyssinus extract, ALK-



Abello, Denmark), were added at final concentrations of 5, 20, 50 ng/mL. These concentrations were chosen based on a dose-response curve (**Figure 1**). The samples were incubated for 30 minutes at 37 °C in agitation. The degranulation was stopped by incubating the samples on ice for 5 minutes and then, 5 µL of the monoclonal antibodies anti-IgE FITC and CD63 PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) were added to each tube to characterize basophils and activation respectively. After 20 minutes at 4°C in dark, 2 mL of pre-warmed lysing solution was added and centrifugated 5 minutes at 4°C. Cells were washed and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, BD Bioscience) by acquiring at least 500 basophils per sample. Results were considered as positive when the stimulation index (SI), calculated as the ratio between the percentage of degranulated basophils with DP and the negative control, was  $\geq 2$  in at least one of the allergen concentrations mentioned above. This value was selected after the performance of a ROC curve comparing BAT results between patients and controls, since this value allows adequate sensitivity and specificity for both LAR and AR subjects (data not shown). When the percentage of spontaneously activated basophils was lower than 2.5%, we required an additional condition, i.e. that the percentage of basophils activated after contact with the antigen should be  $\geq 5\%$ , as previously described (20).

### **Statistical Analysis**

Data were expressed as median and range. The clinical and demographic data were compared between groups by  $\chi^2$ -analysis and the Mann–Whitney U-test. Friedman's test was used to examine the overall differences. If significant differences occurred, the Wilcoxon's signed-ranks test was used to identify them within groups. Correlation between NPT and BAT was obtained calculating the Kappa index as described (21). All P-values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### ***Subjects' Characteristics***

A total of 86 subjects were included in the study. The demographic and clinical characteristics of these patients are summarized in **Table 1**. The study population was mostly young females. All subjects from AR, LAR and NAR groups had rhinitis symptoms two years or more (AR: 6.1 yrs (2-35), LAR: 6.3 yrs (2-50), NAR: 5.8 yrs (2-48),  $p$ : n.s.). Comorbidities such as asthma were present in 37% of AR patients, in 31% of LAR patients and in 35% of NAR. Conjunctivitis was also present in 74% of LAR subjects, 77% of LAR and 79% of NAR. Total IgE was higher in AR subjects than in LAR, NAR and controls (AR: 430 (53-4010), LAR: 56.5 (4-338), CG: 23 (4-213), NAR: 25 (4-248),  $p < 0.05$ ). Specific IgE was only positive in the AR group (29.1 kU/L, range 0.9-110 kU/L). NPT-DP was positive in all AR and LAR patients and negative in both control groups.

### ***Dose-response curve for basophil activation test***

For performing the BAT, DP was added to basophils of all 86 participants at final concentrations of 5, 20 and 50 ng/mL. These concentrations were chosen based on a dose-response curve, where sequential dilutions of DP were incubated with basophils of positive subjects (AR) and healthy controls. As shown in **Figure 1**, DP concentrations of 200 ng/ml and lower did not induce activation of basophils in controls. Concentrations of DP higher than 50 ng/ml (100, 200 and 400 ng/ml) did not produce any significant increase in stimulation index (SI) values in positive subjects compared to the 50 ng/ml concentration.

### ***LAR subjects show positive basophil activation test with *D. pteronyssinus****

Basophil activation test with *D. pteronyssinus* was performed in all 86 participants, and results are summarized in **Figures 3 a-d**. The stimulation index (SI) obtained for each patient after incubation with different DP concentrations and their respective positive controls are represented as individual points, and the SI cut-off point for positive results is represented as a horizontal bar. BAT with DP was positive in 29 out of 32 of AR

patients, which represents 90.6% of all cases (**Figure 3A**). In LAR subjects, 14 out of 30 had a positive BAT with DP (46.7% of all cases, **Figure 3B**). Two out of 10 non-allergic rhinitis controls had a positive test (20%, **Figure 3C**), whereas 1 out of 14 healthy controls, with no history of allergic rhinitis, negative skin testing/sIgE to DP and negative NPT-DP had positive results (**Figure 3D**), which represent 7% of all cases.

***Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and concordance of the test in AR and LAR groups***

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of BAT assay were calculated for AR and LAR groups. Results are summarized in **Table 2**. BAT results in AR patients showed a sensitivity of 90.6% and specificity of 92.9%, and in LAR showed a sensitivity of 46.7% with the same specificity (92.9%). Regarding PPV, for the AR group was 96.7% and for LAR was 93.3%. NPV was 81.3% for AR subjects and 44.8% for LAR respectively. Concordance of BAT with NAPT (kappa index) was estimated in AR subjects, obtaining kappa index of 0.8 ( $p=0.0001$ ) that is considered substantial according to the classification of Landis *et al* (21). Concordance of BAT in LAR subjects was also significant with a kappa index of 0.3 ( $p=0.01$ , fair concordance).

## DISCUSSION

Allergic rhinitis (AR) affects subjects of any age worldwide, causing an important impairment in work/school performance, onset of significant comorbidities, increased healthcare costs and decrease in the quality of life. Therefore, an early diagnosis of this entity can improve their clinical evolution and management of the disease, including the identification of a responsible aeroallergen (22).

The use of SPT and serum sIgE, although widely used as a screening method, is not sufficient to differentiate between AR and non-allergic rhinitis (NAR), since evidence of a localized allergic response in the nasal mucosa has already been described in patients with local allergic rhinitis (LAR) (23). LAR is a phenotype of AR characterized by the presence of a nasal Th2 allergic inflammatory response with local production of specific IgE antibodies and a positive response to a NAPT without evidence of systemic atopy assessed by conventional diagnostic tests. LAR is commonly detected in young people, with a prevalence of 26% in subjects affected with rhinitis, with severity, nasal symptoms, comorbidities and disease evolution very similar to AR (6).

The diagnosis of LAR is based mostly on the performance of NAPT and/or demonstration of local synthesis of sIgE (1). Both methods have technical and practical limitations. The NAPT is considered the gold standard in the diagnosis of both local and systemic AR (1,4,9), with some limitations in terms of time expense and personnel use. Measurement of sIgE in nasal lavage has proved useful for detecting local sensitization (9,11) although the sensitivity of the test is rather low (22%-40%), except for alternaria where a concomitant positivity of NAPT and nasal IgE test was reported in 70% of children with rhinitis (12) once the dilution effect was avoided (24).

Peripheral basophils are key cells in the allergic response, and the basophil activation test (BAT) is a validated and reproducible technique for *in vitro* diagnosis of sensitization to aeroallergens, hymenoptera venom and some drugs (25). Recently, Gómez et al. demonstrated that 50% of subjects with LAR to *D. pteronyssinus* had a positive BAT (13), being this response IgE-dependent and allergen specific. However,

studies were performed in a small sample of patients.

In the present manuscript, the results found in the study by Gómez *et al* have been replicated in a larger population of systemic (n=32) and local (n=30) allergic rhinitis patients. BAT with DP was positive in 90.6% of cases, whereas in LAR subjects 14 out of 30 had a positive BAT with DP (46.7% of all cases). These data are very similar to the figures reported in the first study (85% of positive BAT in AR patients and 50% in LAR patients), supporting the previous findings in this population. Regarding the two control groups used, we found a 20% of positive BAT in non-allergic and in 7% of healthy controls. Regarding the specificity of BAT, it showed a high specificity for both AR and LAR subjects, with a high PPV. Sensitivity and NPV was not that high for LAR subjects, reaching values of 46.7% and 44.8% respectively. The concordance between NAPT and BAT was substantial for AR subjects (kappa index =0.8, p=0.0001), and fair for LAR subjects (kappa index=0.3, p=0.01).

The fact that LAR subjects have a positive BAT in response to allergens raises interesting questions about the mechanism that may cause this phenomenon, since the possibility of having specific IgE in the surface of the basophils is in conflict with the definition of LAR as an entity with absence of systemic atopy. IgE-secreting plasma cells are localized in lymphoid follicles in the respiratory and gastrointestinal tracts (26). Some authors have demonstrated that IgE concentration is higher in nasal washings than in serum in patients with asthma (27), regardless of having positive or negative SPT. Another study revealed that 70-80% of the total IgE was synthesized locally in the organ involved, with serum exudation accounting for the remainder (28), implying that local and systemic IgE may have different characteristics in those two compartments. Therefore, there is evidence that the respiratory mucosa is a major site of IgE synthesis, and that most of this IgE stays locally bound to high- and low-affinity IgE receptors, and circulating IgE represents the “spill over” from this process (3,4,14,23,29). However, the trafficking of IgE-expressing cells and the exchange of

IgE antibodies between the nasal mucosa, the general circulation and bone marrow still remains an issue today.

In terms of the positive responses in the BAT, there are possible explanations to this phenomenon. Some allergens may be able to produce a non-specific activation of the basophils (by proteases or other causes) in some susceptible subjects with a basophil “releaser” phenotype (30). However, in this study there is a high concordance between the positive NAPT and BAT results with *D. pteronyssinus* and the specificity for both AR and LAR subjects is very high. Also, the previous experiments performed with wortmannin confirmed the fact that this response is allergen-specific and IgE dependent (13). We cannot however rule out the possibility that other potential IgE-dependent mechanisms, such as superantigens or free light chains may also play a role in these basophil responses (31,32).

Despite the ample evidence of the relevance of local allergen-specific IgE production, SPTs and serum specific IgE detection against common allergens are still used in the clinical practice giving in some cases false negative results. It seems of the highest importance the search of the right diagnosis in those subjects where clinical symptoms and allergy test results are not in agreement. In those cases, exploration of the target organ by means of NAPT will help to distinguish between LAR and NAR subjects.

In this study, we demonstrated that BAT is a highly specific test with a high PPV, although sensitivity is only moderate. These figures reported in the pilot study have been confirmed in a large population of subjects with almost no variation. BAT is a reproducible technique that may be available in more clinical settings than the NAPT, and its use may contribute to support the diagnosis of LAR.

## REFERENCES

1. Rondón C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG et al. Local Allergic Rhinitis: Concept, Pathophysiology and Management. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1460-7.
2. Powe DG, Jagger C, Kleinjan A, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. 'Entropy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1374-9.
3. Huggins KG, Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet* 1975;2: 148–150.
4. Powe DG, Bonnin AJ, Jones NS. 'Entropy': local allergy paradigm. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40(7):987-97.
5. Rondón C, Campo P, Galindo L, Blanca-Lopez N, Cassinello MS, Rodriguez-Bada JL et al. Prevalence and Clinical Relevance of Local Allergic Rhinitis. *Allergy* 2012; 67:1282-8.
6. Rondón C, Campo P, Zambonino MA, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Melendez L et al. Follow-up study in local allergic rhinitis shows a consistent entity not evolving to systemic allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133 (4):1026-31.
7. Molgaard E, Thomsen SF, Lund T, Pedersen L, Nolte H, Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. *Allergy* 2007; 62: 1033-7.
8. Rondón C, Blanca-López N, Aranda A, Herrera R, Rodriguez-Bada JL, Canto G, et al. Local allergic rhinitis: Allergen tolerance and immunologic changes after preseasonal immunotherapy with grass pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 107(4): 1069-1071
9. Rondón C, Romero JJ, López S, Antúnez C, Martín-Casañez E, Torres MJ, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:899-905.
10. Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG et al.

- Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clin Transl Allergy* 2011;10;1(1):2.
11. Rondón C, Doña I, López S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, et al. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy* 2008;63:1352-8.
  12. Fuiano N, Fusilli S, Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012; 40:71–4.
  13. Gómez E, Campo P, Rondón C, Barrionuevo E, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Role of basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013. 132(4):975-6.e1-5.
  14. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Geavert P, Lambrecht BN. The who, where and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 635-45.
  15. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic Tests Based on Human Basophils: Potentials, Pitfalls and Perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141:79-90.
  16. Campo P, Rondón C, Villalba M, Mayorga C, Sanchez-Quintero MJ, Palomares O et al. Evaluation of in vivo and in vitro responses to nOle e1 in systemic and local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunology* 2013; 131, Spp, Page AB237 (839).
  17. Rondón C, Campo P, Herrera R, Blanca-Lopez N, Melendez L, Canto G et al. Nasal allergen provocation test with multiple aeroallergens detects polysensitization in local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128: 1192-7.
  18. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012;67: 18-24.
  19. Hilberg O, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recommendations for technical specifications and standard operating procedures [published erratum in *Rhinology* 2001;39:119] *Rhinol Suppl* 2000;16:3–17. *Clin Immunol* 1999;104: 301–304. *J Biol*



Chem. 1993;268: 25846-56.

20. Gómez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. Clin Exp Allergy. 2009;39:1217-24.

21. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33:159-74.

22. Bousquet J, Fokkens W, Burney P, Durham SR, Bachert C, Akdis CA et al. Important research questions in allergy and related diseases: nonallergic rhinitis: a GA2LEN paper. Allergy. 2008; 63(7): 842-53.

23. Platts-Mills TA. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. J Immunol 1979;122(6):2218-25.

24. Marcucci F, Sensi L: A new method for IgE detection in nasal mucosa. Clin Exp Allergy 1989;19:157-62.

25. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow?. Clin Exp Allergy. 2004;34: 332-9.

26. Tada T, Ishizaka K. Distribution of gamma E-forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey. J Immunol 1970;104(2):377-87.

27. Ishizaka K, Newcomb RW. Presence of gammaE in nasal washings and sputum from asthmatic patients. J Allergy 1970;46(4):197-204.27.

28. Deuschl H, Johansson SG. Immunoglobulins in tracheo-bronchial secretion with special reference to IgE. Clin Exp Immunol 1974;16(3):401-12.

29. Gould HJ, Takhar P, Harries HE, Durham SR, Corrigan CJ. Germinal-centre reactions in allergic inflammation. Trends Immunol 2006; 27(10):446-52.

30. Nguyen KL, Gillis S, MacGlashan DW. A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. J Allergy Clin Immunol. 1990;85(6):1020-9

31. Salib RJ, Harries PG, Nair SB, Howarth PH. Mechanisms and mediators of nasal symptoms in non-allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:393-404.
32. Powe DG, Groot Kormelink T, Sisson M, Blokhuis BJ, Kramer MF, Jones NS, Redegeld FA. Evidence for the involvement of free light chain immunoglobulins in allergic and nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(1):139-45.e1-3.

## TABLE AND FIGURE LEGENDS

### Table 1.

Clinical characteristics of subjects with allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR), non allergic rhinitis (NAR) and controls (CG).

SD: standard deviation; IU: international units; kU: kilounits; SPT: skin prick testing; ID: Intradermal testing; NPT: nasal provocation test; DP: *Dermatophagoides pteronyssinus*.

### Table 2.

Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and concordance of basophil activation test (BAT) with *D. pteronyssinus* in allergic rhinitis (AR) and local allergic rhinitis (LAR) groups.

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; CG: control group.

### Figure 1.

Dose-response curve with serial dilutions of *D. pteronyssinus* extract performed in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control group (CG) subjects.

### Figure 2 A-D.

Basophil activation test after adding DP at 5, 20 and 50 ng/mL. The horizontal line indicates the cut-off point of the assay.

**3A:** allergic rhinitis subjects (AR) n=32; **3B:** local allergic rhinitis subjects (LAR) n=30;

**3C:** non-allergic rhinitis subjects n=10; **3D:** healthy control group (CG) n=14;

SI: stimulation index; DP: *D. pteronyssinus*; IgE C+: positive IgE control.

**Table 1.**

I	Age (y) Median (range)	Sex (F/M)	Diagnosis of rhinitis(y) Median(range)	Asthma Symptoms (%)	Conjunctivitis (%)	Total IgE (IU/ml) Median (range)	Specific IgE (kU/L) Median (range)	Positive SPT/ID DP (%)	Positive NPT-DP (%)
<b>AR n=32</b>	30.1 (18-62)	17/15	6.1 (2-35)	37%	74%	430 (53-4010)*	29.1 (0.9-100)	100%*	100%
<b>LAR n=30</b>	34.8 (15-58)	23/7	6.3 (2-50)	31%	77%	56.5 (4-338)	<0.35	0%	100%
<b>CG n=14</b>	36 (26-50)	12/2	n/a	n/a	n/a	23 (4-213)	<0.35	0%	0%
<b>NAR N=10</b>	34.2 (17-60)	8/2	5.8 (2-48)	35%	79%	25 (4-248)	<0.35	0%	0%

**Table 2.**

	Positive BAT (%)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Kappa Index
<b>AR n=32</b>	29/32 (90.6%)	90.6%	92.3%	96.7%	81.3%	0.8 (p=0.0001)
<b>LAR n=30</b>	14/30 (50%)	46.7%	93%	93.3%	44.8%	0.3 (p= 0.01)
<b>CG n=14</b>	1/14 (7%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

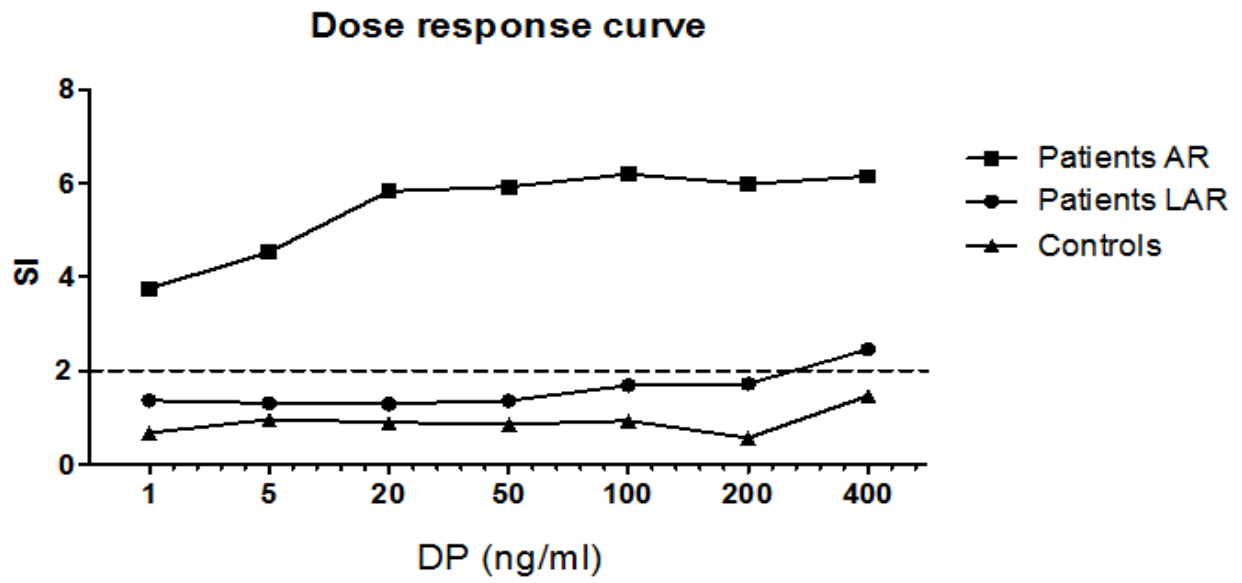


Figure 1

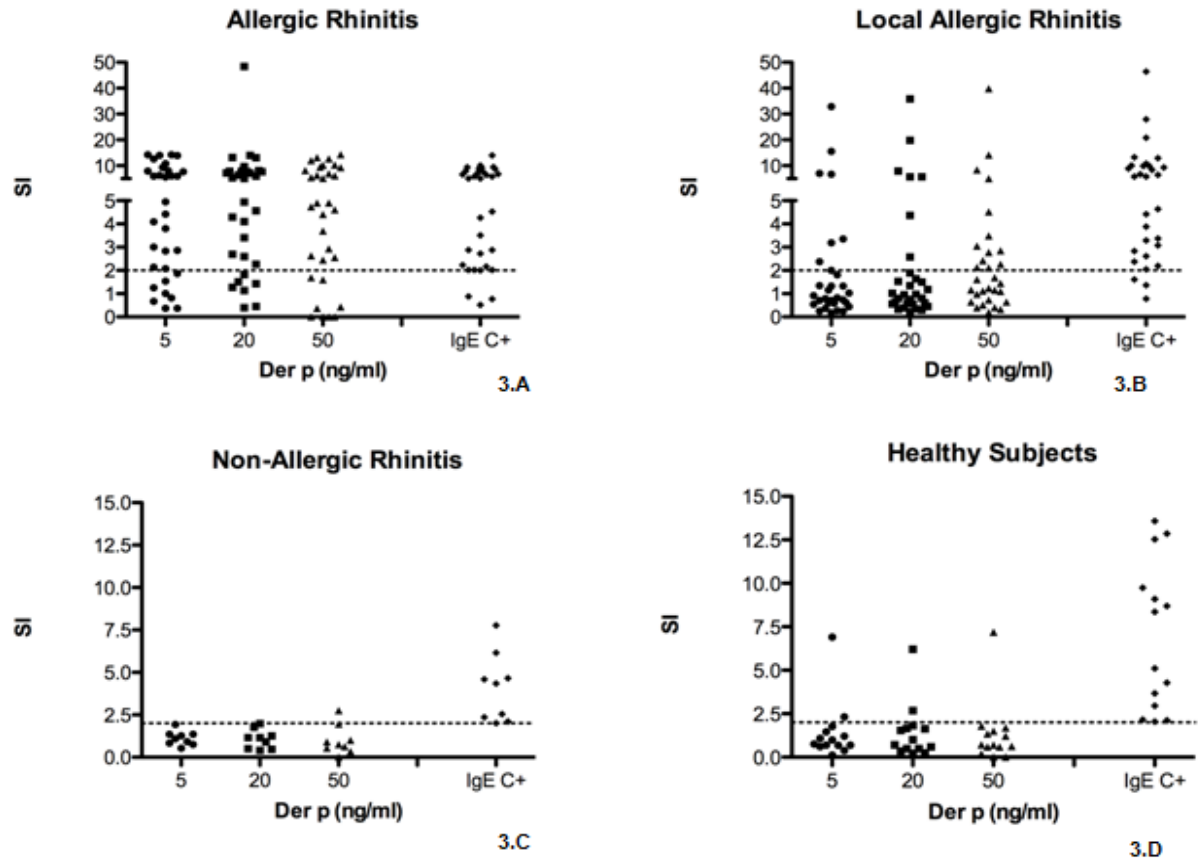


Figure 2



**Artículo 3:** Paloma Campo; Mayte Villalba; **Esther Barrionuevo**; Carmen Rondón; Luisa Galindo; María José Sánchez-Quintero; Juan Carlos López-Rodríguez; María José Torres; Miguel Blanca; Cristobalina Mayorga. *In vivo* and *in vitro* responses to native Ole e1 (*nOle e1*) in systemic and local allergic rhinitis. (en revisión).





Title: *In vivo* and *in vitro* responses to native Ole e1 (nOle e1) in systemic and local allergic rhinitis

Authors' list: Paloma Campo, MD, PhD1, Maria Teresa Villalba, PhD2, Esther Barrionuevo, MD1, Carmen Rondón, MD, PhD1, Luisa Galindo, R.N1, Maria José Sánchez-Quintero, PhD3, Juan Carlos López-Rodríguez, PhD3, María José Torres MD, PhD1, Miguel Blanca MD, PhD1<sup>∞</sup>, Cristobalina Mayorga, PhD3<sup>∞</sup>

Departmental and Institutional Affiliations:

1U.G.C. Allergy, IBIMA, Regional University Hospital of Málaga, UMA, Málaga, Spain

2Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

3Allergy Research Laboratory, IBIMA, Regional University Hospital of Málaga, UMA, Málaga, Spain

<sup>∞</sup>both authors contributed equally to this manuscript

Corresponding Author:

Cristobalina Mayorga, MD, PhD. Allergy Research Laboratory, IBIMA, Regional University Hospital of Málaga, UMA

Plaza Hospital Civil s/n, Pabellón 5, 29009 Málaga, Spain

E-mail: mayorga.lina@gmail.com; Telephone: +34-951-290224 Fax: +34-951-290302

Word count: 3608 words

Funding: This study was supported by grants from the Spanish Health Ministry Fund for Health in Spain (FIS) network RIRAAF (RD07/0064) and RD12/0013/0015; FIS PI11/02619, PI12/00900 and PI12/02481; SAF-2011-26716 from Ministry of Innovation; PI-0542-2010and CTS-7433 from Andalusian Health Ministry.

Keywords:

Basophil activation test, local allergic rhinitis, nasal allergen provocation test, purified allergen

Abbreviations

AR: allergic rhinitis

BAT: basophil activation test

CG: control group

ID: intradermal skin testing

IU/ml: international units per milliliter

kU/L: kilounits per liter

LAR: local allergic rhinitis

NAPT: nasal allergen provocation test

OL: olive tree pollen

sIgE: specific IgE

SPT: skin prick testing

## ABSTRACT

**Introduction:** Ole e 1 is one of the major allergens from olive tree pollen (OL). The goal of the study was to thoroughly evaluate the in vivo and in vitro responses to nOle e1 as a model of purified allergen in a well-phenotyped group of allergic rhinitis (AR) and local allergic rhinitis (LAR) patients with known sensitization to OL demonstrated by nasal allergen provocation test (NAPT).

**Methods:** Twelve subjects with AR (positive NAPT with OL, positive skin testing and specific IgE (sIgE) to OL), 12 subjects with confirmed LAR (positive NAPT with OL, negative skin testing and sIgE to OL), and 12 subjects as control group (CG) (negative NAPT, negative skin testing and sIgE to OL). Skin testing and NAPT with nOle e1 were performed in all subjects. Inflammatory mediators (ECP, tryptase) were measured in nasal lavages before and at different times after NAPT. Serum sIgE to nOle e1, e2, e3, e7, e9 and e11 were measured by ELISA. Basophil activation tests (BAT) with both whole extract and purified nOle e1.

**Results:** All AR subjects (12/12) and 10/12 (83%) of LAR subjects had a positive NAPT to nOle e1. ECP levels in nasal lavages were significantly increased at 15, 60 and 120 minutes after NAPT in both AR and LAR subjects compared with CG ( $p<0.05$ ). Tryptase levels in nasal lavages were increased at 15 minutes after NAPT for AR and LAR groups ( $p<0.05$ ) compared to CG. Only AR subjects showed positive values to OL allergens in serum, being nOle e1 and Ole e 2 the most commonly detected (60%). All AR subjects had positive BAT responses to OL and 10/12 to nOle e1 (83%); 8/12 LAR (66.6%) had a positive BAT with OL and 4/12 (33%) to nOle e1, with only one subject of the control group with a positive BAT to both OL and nOle e1 (8%).

**Conclusion:** Both AR and LAR have a similar in vivo response to nOle e1 with release of inflammatory mediators. The BAT with OL and nOle e1 showed sensitivity between 66.6 and 33% in LAR group respectively. This study confirmed the specific basophil

activation with pollens in patients with a local allergic response and confirmed those previously obtained in LAR subjects allergic to dust mites.

## INTRODUCTION

Olive tree (*Olea europaea*) pollen allergy is a complex disease influenced by both environmental and genetic factors (1-4), and represents one of the most important causes of respiratory allergy in Mediterranean regions and some areas of North America (5). Exposure to olive tree pollen causes naso-conjunctival symptoms, as well as asthma exacerbations between late April and early June.

Several allergens have been characterized in the olive tree pollen, many of which show sequence homology to proteins from different vegetable tissues (1,6,7). Ole e 1 is a polymorphic protein of 145 amino acids with a glycosylated (80-85% of the total allergen) and non-glycosylated variant with molecular masses of 20 and 18.5 kD respectively (8,9). It is the most abundant protein of olive pollen extracts, being up to 20% of the total protein content. It is also one of the major allergens from olive tree pollen, with an IgE-binding frequency of almost 80% among patients with olive pollinosis (10,11). The structure and characteristics of Ole e 1 have been thoroughly studied and therefore constitutes an interesting model of purified allergen (9, 12-15). Several studies have been conducted over the years using both native and recombinant forms of Ole e1, such as measurement of specific IgE (sIgE)(16), skin prick testing (SPT)(17), genetic association studies (2-4) and histamine-release assays (18). Some authors have used whole olive extract to perform nasal challenges mostly for diagnostic purposes (19,20). A recent study evaluated the Th1, Th2 and T regulatory responses in nasal biopsies of subjects with AR due to OL sensitization (21). However, there are no specific studies that evaluate in depth the nasal and cellular responses to Ole e1 in subjects with AR caused by olive tree pollen sensitization.

Local allergic rhinitis (LAR) is a phenotype of AR characterized by the presence of a nasal Th2 allergic inflammatory response, local production of specific IgE (sIgE) antibodies and a positive response to nasal allergen provocation test (NAPT) (22,23).

In LAR subjects, specific nasal responses to allergens have been demonstrated with dust mites (24), alternaria (25), grass and olive pollen (26). Inflammatory mediators release, cellular Th2 response and secretion of specific IgE have been detected in nasal lavages after the challenge with all these allergens (24, 27). NAPT have been performed in all cases with whole commercial extracts, which contain a known amount of major allergens reported by the company. There are some studies evaluating nasal responses after challenge with purified allergens performed in classic AR patients (28,29), but up to date there are not equivalent studies done in LAR subjects. Moreover, a recent study by Gómez et al. demonstrated a basophil response in 50% of subjects with LAR to *D. pteronyssinus* (30), and that the basophil stimulation was IgE specific demonstrated by wortmannin pre-treatment of the assay. However, these assays have been only performed with dust mites and have not been tested with other allergens such as pollens.

The aim of this study was to thoroughly evaluate the in vivo and in vitro responses to native Ole e1 (nOle e1) as a model of purified allergen in a well-phenotyped group of AR and LAR patients with known sensitization to OL demonstrated by NAPT. The AR group represents the classic model of rhinitis, and the LAR group represents a novel phenotype where responses to purified allergens have not been yet investigated. The in vivo responses were evaluated by means of skin testing and NAPT, with measurement of inflammatory mediators before and after challenge. The in vitro responses were evaluated by measuring sIgE to nOle e1 and other OL allergens in serum, basophil activation test (BAT) with both whole extract and purified nOle e1.

## METHODS

### Study subjects

The study included 12 subjects with allergic rhinitis (AR), 12 with local allergic rhinitis (LAR) and 12 healthy subjects as control group (CG). Subjects were recruited in the Allergy Department at the Regional Hospital of Málaga. The study was performed outside the pollen season when patients were symptom-free and no treatment was required.

AR inclusion criteria: history of seasonal rhinitis symptoms due to exposure to olive tree pollen (OL)  $\geq 2$  years, positive nasal allergen provocation test with olive tree pollen (NAPT-OL), positive skin prick test (SPT) and serum specific IgE (sIgE) to OL.

LAR inclusion criteria: history of seasonal rhinitis symptoms due to exposure to olive tree pollen (OL)  $\geq 2$  years, positive NAPT-OL, negative skin testing to OL (intradermal (ID)/SPT), and negative sIgE to OL and a battery of common aeroallergens.

CG inclusion criteria: The control subjects had no allergic or nasal diseases and negative NAPT-OL. They also had negative SPT/ID and serum sIgE to aeroallergens.

Exclusion criteria: subjects with chronic rhinosinusitis evaluated by CT-scan; massive polyposis, septal perforation, total nasal blockage, upper respiratory infection or any other condition that does not allow to perform the nasal challenge; pregnant or breastfeeding patients; patients who had autoimmune and/or any other severe disease that contraindicated NPT; subjects with psychosomatic disorders or unable to follow the instructions.

The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committees. All participants and parents of patients below 16 years old were informed and signed the corresponding informed consent.

Purification and characterization of nOle e1



nOle e1 allergen was purified from ethyl-ether-defatted olive tree (*Olea europaea*) pollen (Allergon AB) extracted in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0, containing 1mM PMSF (1 g pollen/30 ml) for 1h as described (9). After centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4° C the supernatant was collected. The procedure was repeated three times and supernatants were pooled together and stored at -20° C. Three chromatographic steps, two gel-permeation and a reverse phase-HPLC, were necessary for the purification of nOle e 1. Olive pollen extract was loaded into a Sephadex G-75 medium column and afterwards in a Sephadex G-75 superfine, both in 0.2 M ammonium bicarbonate, pH 8.0. Fractions containing nFra e 1 were finally loaded onto a Nucleosil C18 column with an acetonitrile gradient (0-60%) in 0.1% trifluoroacetic acid. The elution profile was continuously monitored at 214 nm.

#### Skin testing

SPTs were performed with a wide panel of prevalent aeroallergens in the area: *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Phleum*, *Lolium*, *Cupressus*, *Platanus*, *Olea europaea*, *Chenopodium*, *Artemisia*, *Parietaria*, *Salsola kali*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, dog and cat epithelia (ALK-Abelló, Madrid, Spain) (31). Also, SPTs with nOle e1 at 0.5, 1, 5 and 10 µg/ml were performed in all subjects. ID skin test was performed with freshly reconstituted freeze-dried OL extract (0.6 µg/ml) (ALK-Abelló) as described in all LAR and CG subjects (27).

#### Nasal provocation test with whole olive extract and nOle e1

NAPT with OL extract and nOle e1 were performed according to published methods (26,27). A nasal challenge with 0.9% was performed prior to the application of the allergen in the nose in order to rule out nasal hyperresponsiveness. Two puffs (100 µL) of freshly reconstituted OL extract (Ole e1: 6 µg/mL, ALK-Abelló, Denmark) were applied using a metered pump. For the nasal challenge, 100 µ of purified nOle e1 at serial dilutions of 0.5, 1, 5 and 10 µg/mL were applied per nostril by means of a

micropipette. Each challenge with nOle e1 was performed at least 2 weeks apart from the one performed with OL. Responses were monitored by symptoms' score (rhinorrhea, itching, nasal obstruction and sneezing) placing a vertical mark on a horizontal visual analog scale (VAS) of 100 mm. The volume of the nasal cavity that corresponds to the lower turbinate (vol 2–6 cm) in each nostril was measured after challenge at different timepoints (15, 60 and 120 minutes) by acoustic rhinometry (SRE 2000 Rhinometer, Rhinometrics, Lynge, Denmark) following the current guidelines (32,33). A positive NAPT was considered to be an increase  $\geq 30\%$  in the total nasal symptoms and a decrease  $\geq 30\%$  in the total vol 2-6 cm of both nasal cavities compared with the baseline test.

#### ECP and tryptase measurement in nasal lavages

Nasal lavages were obtained from both nostrils at baseline, 15 and 60 minutes after NAPT following the Naclerio method (34). Measurement of tryptase and ECP was performed (UNICAP; Phadia, Uppsala, Sweden).

#### Total and specific IgE measurement in serum and nasal lavage

Serum total and sIgE were measured to the same aeroallergens of the SPT panel including OL by fluoroenzyme immunosorbent assay (UNICAP, Thermofisher, USA).

Also, specific IgE antibodies against Ole e 1, Ole e2, Ole e3, Ole e7, Ole e9 and Ole e11 were measured by ELISA in serum of all participants before and after challenge. Briefly, ELISA was performed in microtiter plates coated with 100  $\mu\text{g}/\text{well}$  of each aforementioned purified allergen. Plates were incubated with sera (diluted 1:10). The binding of human IgE was detected by mouse anti-human IgE antibodies (diluted 1:5000) donated by Alk-Abelló (Madrid, Spain) followed by horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:5000; Pierce Chemical Co, Rockford, Ill). The reaction was developed with o-phenylendiamine and the optical density (OD) measured at 492 nm. Each value was calculated as mean of two determinations (13).

### Basophil activation test with whole olive extract and nOle e1

Hundred microliters of heparinized whole blood was aliquoted per test and 20  $\mu$ L of stimulation buffer was added and incubated for 10 minutes with agitation at 37°C in a water bath as described (30). After this, 100  $\mu$ L of the washing solution was added to the negative control tube, 100  $\mu$ L of anti-human IgE antibodies (BD Pharmingen San Diego, CA, USA) to the positive control tubes and 100  $\mu$ L of the allergen (OL extract, ALK-Abello, Denmark and purified nOle e1), were added at final concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 5  $\mu$ g/mL. These concentrations were chosen based on a dose-response curve (data not shown). The samples were incubated for 30 minutes at 37 °C in agitation. The degranulation was stopped by incubating the samples on ice for 5 minutes and then, 5  $\mu$ L of the monoclonal antibodies anti IgE-FITC and CD63-PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) were added to each tube to characterize basophils and activation respectively. After 20 minutes at 4°C in dark, 2 mL of pre-warmed lysing solution was added and centrifuged 5 minutes at 4°C. Cells were washed and analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, BD Bioscience) by acquiring at least 500 basophils per sample. Results were considered as positive when the stimulation index (SI), calculated as the ratio between the percentage of degranulated basophils with allergen and the negative control, was  $\geq 2$  in at least one of the allergen concentrations mentioned above. When the percentage of spontaneously activated basophils was lower than 2.5%, we required an additional condition, i.e. that the percentage of basophils activated after contact with the antigen should be  $\geq 5\%$ , as previously described (35).

### Statistical Analysis

Data were expressed as median and range. The clinical and demographic data were compared between groups by chi square analysis and the Mann–Whitney U-test. Friedman's test was used to examine the overall differences. If significant differences

occurred, the Wilcoxon's signed-ranks test was used to identify them within groups. For cellular studies, comparisons of quantitative variables were carried out by non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test. All p-values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### Clinical characteristics of participants

The study included 12 subjects with AR, 12 with LAR and 12 controls, and studies were performed outside the pollen season when patients were asymptomatic. The clinical and demographical data are summarized in Table 1. In all groups subjects were mostly non-smoker young women (AR mean age: 33.1 yr, LAR: 38.2 yr, CG: 37.6 yr), although there were more active smokers in both LAR and CG ( $p<0.05$ ). The mean time of rhinitis symptoms were 8.5 years (range 2-30) for AR subjects and 9.7 years (3-20) for LAR. Sixty six percent of AR subject had also asthma symptoms compared to 58% of LAR patients.

### In vivo responses to OL and nOle e1

#### Skin testing

SPTs with nOle e1 at 0.5, 1, 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  were performed in all subjects. All AR subjects recognized nOle e1 in SPT and none of the LAR or CG subjects (Table 1). ID testing performed with commercial OL extract at 0.6  $\mu\text{g/ml}$  were all negative in both LAR and control groups.

### NAPT responses to nOle e1 and mediators' release in nasal lavages

A summary of the responses to NAPT are shown in Figures 1A and B. All AR and LAR subjects had a positive NAPT challenge to whole OL commercial extract as an inclusion criterion. Two weeks later, serial dilutions at 0.5, 1, 5 and 10  $\mu\text{g/mL}$  of nOle e1 were applied in all subjects, and responses were monitored by acoustic rhinometry and visual analogue scale (VAS). All AR subjects (12/12) had a positive response to nOle e1, and 10/12 (83%) of LAR subjects had a positive NAPT. Healthy controls did not react to either OL or nOle e1 (Figure 1A). Sixty percent of AR and 38% of LAR patients reacted at 0.5  $\mu\text{g/mL}$  dose of nOle e1 for NAPT, whereas 62% of LAR required

1 µg/mL or higher nOle e1 concentration in order to obtain a positive NAPT response compared to 40% of AR subjects (Figure 1B).

The median VOL 2-6 cm decreased significantly from 100% (value obtained after saline lavage) to 50% at 15 minutes in AR subjects and to 55% in LAR after NAPT with nOle e1 (Figure 2A). The maximum reduction was observed at 15 minutes in both groups. Patients from AR and LAR groups also showed significant increases in total VAS scores compared to controls (Figure 2B).

ECP levels in nasal lavages were significantly increased at 15, 60 and 120 minutes after NAPT in both AR and LAR subjects compared with CG ( $p<0.05$ , Figure 3A). Tryptase levels in nasal lavages were increased at 15 minutes after NAPT for AR and LAR groups, decreasing those levels at 120 minutes ( $p<0.05$ , Figure 3B).

In vitro responses to nOle e1

Serum sIgE to nOle e1 and other OL allergens

Mean total IgE was 322.9 IU/ml in AR subjects ( $p<0.05$  compared to LAR and CG), whereas LAR subjects had low total IgE levels similar to controls. Specific IgE to OL was also significantly higher in AR group as expected ( $p<0.05$ ) (Table 2). Serum specific IgE antibodies against Ole e 1, Ole e2, Ole e3, Ole e7, Ole e9 and Ole e11 were also measured by ELISA in all subjects. Both LAR and CG subjects had undetectable levels of sIgE to all allergens tested. AR subjects showed positive values to allergens, being nOle e1 and Ole e 2 the most commonly detected (60%), followed by Ole e 7,9 and 11 (20%) and nOle e 3 (10%).

Basophil activation test (BAT) with OL and nOle e1

BAT was performed with OL whole commercial extract and nOle e1 in all subjects at final concentrations 0.1, 0.5, 1 and 5 µg/mL. Figure 4 A represents the SI of all subjects after basophil stimulation with both OL and nOle e1. The horizontal dotted line

represents the cut-off point for a positive response. All AR subjects had positive responses to OL stimulation, and 10/12 AR subjects (83%) had a positive response to nOle e1 (Figure 4B). In the LAR group, 8/12 subjects (66.6%) had a positive BAT with OL, and 4/12 with nOle e1 (33%). In the control group, only one subject (8.3%) had a positive BAT with both OL and nOle e1 stimulation.

## DISCUSSION

Olive tree pollen (OL) is one of the most important causes of allergy in the Mediterranean countries. The role of this pollen as provoking respiratory allergy is well established, and many studies have been done in order to improve the knowledge about this kind of sensitization (5,11,36). Allergy to olive pollen is a complex response regulated by multiple genetic influences, where the association between Ole e1-specific response and DQB1\*0201 has been confirmed (2-4).

Ole e 1 is one of the major OL allergens, and its structure has been thoroughly investigated and for that reason constitutes a very interesting model if purified allergen (37,38). This allergen belongs to a family of proteins, which has been suggested to be related to pollen germination, tube growth and pollen hydration (11). Its reactivity in vivo has been tested in some studies mostly by SPT, along with some in vitro studies (9,10,17,18,39) performed over the years. However, the studies about the in vivo responses after nasal challenge with purified allergens in AR are scarce, and to the best of our knowledge there are no such studies done with Ole e1. Moreover, the responses of the basophil after Ole e1 stimulation have not been studied in depth, since there is only one study performing histamine release in 5 patients after incubation with the Ole e1 carbohydrate (18).

In this study, the aim was to investigate the in vivo and in vitro responses to nOle e1 as a model of purified allergen in a group of AR and LAR patients sensitized to OL where the phenotype had been confirmed by NAPT. The AR patients are the classic model of rhinitis, whereas LAR group are a more novel phenotype where responses to purified allergens have not been yet investigated. Moreover, the basophil response of LAR subjects to pollens was also unknown, since the prior study performed in this group was only done with dust mites (30).



In the present investigation, the *in vivo* responses were evaluated by means of skin testing and NAPT, with measurement of inflammatory mediators in nasal lavage before and after challenge. The *in vitro* responses were evaluated measurement of sIgE to nOle e1 and other OL allergens in serum, basophil activation test (BAT) with both whole extract and purified nOle e1.

The study group (n=36) was comprised of young subjects, mostly non-smoker women, with more than 5 years of disease evolution and with a high association with asthma as major comorbidity. SPTs with nOle e1 at 0.5, 1, 5 and 10 µg/ml were only positive in AR subjects as expected. All AR subjects reacted to nOle e1 after NAPT. Interestingly, almost all LAR subjects (10/12, 83%) had also a positive response to nasal challenge with a purified allergen. This is the first time where *in vivo* positive responses to a purified structure of known allergenicity are demonstrated in LAR subjects. Also, in both AR and LAR subjects a significant decrease in VOL 2-6 measured by acoustic rhinometry and an increase in VAS scores were detected, whereas none of the healthy controls reacted to either OL or nOle e1. Also, mediators' release was observed at different time points in nasal lavages. Both ECP and tryptase were elevated in AR and LAR groups, with no activity in the controls. In general, LAR subjects required higher doses of nOle e1 to obtain a positive response in the nasal mucosa, but still under the maximum dose tolerated by controls that did not elicit nasal obstructions, symptoms or release of mediators.

As expected, serum specific IgE to OL and specific IgE antibodies against Ole e 1, Ole e2, Ole e3, Ole e7, Ole e9 and Ole e11 were only positive in AR subjects, nOle e1 and Ole e 2 the most commonly detected (60%), followed by Ole e 7,9 and 11 (20%). nOle e 3 was only detected in 10% of AR patients.

BAT was positive to OL stimulation in 100% of AR subjects and in 10/12 with nOle e1 (83.3%). In the LAR group 8/12 subjects (66.6%) had a positive BAT with OL. The BAT

responses with purified nOle e1 were lower in this group, with 4/12 (33%) allergen stimulation. In the control group, only one subject (8%) had a positive BAT with both OL and nOle e1 stimulation. These results are in agreement with the ones obtained in a previous study performed by our group (30), where a group of subjects with LAR to *D. Pteronyssinus* (DP) showed a 50% of positive results in the BAT performed with commercial whole extract of DP. In that study, 7% of controls had a positive response in BAT, similar to the figures reported here for OL and nOle e1. This study confirms the presence of allergen-specific IgE in the surface of basophils, since this cell may be the target of the specific IgE leaked from the nose or other target organs (40, 41). However, this fact is in conflict with the definition of LAR as an entity with absence of systemic atopy. Moreover, the exact mechanism that may cause this phenomenon and how the exchange of IgE antibodies between the nasal mucosa and the general circulation is produced still remains unclear (42). Another interesting study in the future will be the bronchial provocation with OL and nOle e 1 in these subjects, since some preliminary studies have shown that patients with LAR to DP and bronchial symptoms also show positive responses to bronchial challenge with DP (43).

In conclusion, this study has described the in vivo and in vitro responses to a purified allergen, nOle e1, in 3 different groups of subjects, demonstrating in vivo a nasal response with obstruction, mediators' release in the classic AR patients and in a different form of AR known as LAR or "entopy", that had not been yet demonstrated. The in vitro studies confirmed the absence of serum specific IgE to OL and OL allergens in both LAR and controls. The BAT was positive in AR and LAR subjects with both OL and nOle e1. This study confirmed the presence of positive BAT with pollens in LAR subjects at a similar percentage described with dust mites before, and also responses to nOle 1 from the basophils of these patients but in a lower percentage. Further studies with higher number of subjects and other whole and purified allergens will be performed in the near future.

## REFERENCES

1. Quiralte J, Palacios L, Rodríguez R, Cárdena B, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Lahoz C. Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:24-30.
2. Cárdena B, Llanes E, Chacártegui M, Sastre B, López E, Mollá R, del Pozo V, Florido F, Quiralte J, Palomino P, Lahoz C. Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:31-5.
3. Aguerri M, Calzada D, Montaner D, Mata M, Florido F, Quiralte J, Dopazo J, Lahoz C, Cardaba B. Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013;27(2):337-50
4. Llanes E, Quiralte J, López E, Sastre B, Chacártegui M, del Pozo V, Palomino P, Lahoz C, Cárdena B. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148(3):228-38
5. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008; 63(11):1550-8
6. Villalba M, Rodríguez R, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*. 2014;66(1):44-54.
7. Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125(3):185-95
8. Villalba M, Rodríguez R, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*. 2014;66(1):44-54. .

9. Villalba M, Batanero E, López-Otín C, Sánchez LM, Monsalve RI, González de la Peña MA et al. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem.* 1993;216(3):863-9.
10. Palomares O, Swoboda I, Villalba M, Balic N, Spitzauer S, Rodríguez R et al. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;141(2):110-8
11. Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, González EM, Monsalve RI, Huecas S, et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy.* 2002;57 Suppl 71:6-16.
12. González EM, Villalba M, Quiralte J, Batanero E, Roncal F, Albar JP, Rodríguez R. Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. *Mol Immunol.* 2006 ;43(6):570-8.
13. Huecas S, Villalba M, González E, Martínez-Ruiz A, Rodríguez R. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem.* 1999; 261(2):539-46.
14. Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem.* 1994; 269(21):15217-22.
15. Martín-Orozco E, Cárdena B, del Pozo V, de Andrés B, Villalba M, Gallardo S et al. Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;104(2):160-70.
16. van Ree R, Aalbers M, Kea O, Marco De La Calle FM, Sempere Ortells JM, Villalba M, et al. A sensitive monoclonal antibody sandwich ELISA for the measurement of the major olive pollen allergen Ole e 1. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000; 122(3):224-8.

17. Quiralte J, González E, Arias de Saavedra JM, et al. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europaea pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122: 101–107
18. Batanero E, Crespo JF, Monsalve RI, et al. IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 147–153
19. Liccardi G, Russo M, Piccolo A, Lobefalo G, Salzillo A, D'Amato M, D'Amato G. The perennial pattern of clinical symptoms in children monosensitized to Olea europaea pollen allergens in comparison with subjects with Parietaria and Gramineae pollinosis. *Allergy Asthma Proc.* 1997 Mar-Apr;18(2):99-105.
20. Unsel M, Ardeniz O, Mete N, Ersoy R, Sin AZ, Gulbahar O, Kokuludag A. Food allergy due to olive. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(6):497-9.
21. Sogut A, Yilmaz O, Kirmaz C, Ozbilgin K, Onur E, Celik O et al. Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 157(4):349-53.
22. Rondón C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG et al. Local Allergic Rhinitis: Concept, Pathophysiology and Management. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1460-7.
23. Powe DG, Bonnin AJ, Jones NS. 'Entropy': local allergy paradigm. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(7):987-97.
24. Rondón C, Romero JJ, López S, Antúnez C, Martín-Casañez E, Torres MJ, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:899-905.

25. Fuiano N, Fusilli S, Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012; 40:71–4.
26. Rondón C, Doña I, López S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, et al. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy* 2008;63:1352-8.
27. Rondón C, Fernández J, López S, Campo P, Doña I, Torres MJ et al. Nasal inflammatory mediators and specific IgE production after nasal challenge with grass pollen in local allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 124 (5): 1005-1011
28. Sánchez-López J, Tordesillas L, Pascal M, Muñoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, et al. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133 (4):1018-1025.
29. Schmid-Grendelmeier P, Holzmann D, Himly M, Weichel M, Tresch S, Rückert B, Menz G, Ferreira F, Blaser K, Wüthrich B, Cramer R. Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;111(6):1328-36.
30. Gómez E, Campo P, Rondón C, Barrionuevo E, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Role of basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013. 132(4):975-6.e1-5.
31. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012;67: 18-24.
32. Hilberg O, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recommendations for technical specifications and standard operating procedures [published erratum in *Rhinology*

2001;39:119] Rhinol Suppl 2000;16:3–17. Clin Immunol 1999;104: 301–304. J Biol Chem. 1993;268: 25846-56.

33. Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG et al. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. Clin Transl Allergy 2011;10;1(1):2.

34. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF Jr, Meyers DA, Norman PS, et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. Am Rev Respir Dis 1983; 128:597–602.

35. Gómez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. Clin Exp Allergy. 2009;39: 1217-24.

36. Quiralte J, Florido F, Arias de Saavedra JM, Gómez A, Sáenz de San Pedro B, González E, Rodríguez R. Olive allergen-specific IgE responses in patients with Olea europaea pollinosis. Allergy. 2002;57 Suppl 71:47-52.

37. Ledesma A, González E, Pascual CY, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. Are Ca<sup>2+</sup>-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. Clin Exp Allergy. 2002;32(10):1476-83

38. González EM, Villalba M, Lombardero M, Aalbers M, van Ree R, Rodríguez R. Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. Mol Immunol. 2002;39(1):93-101.

39. Quiralte J, González E, Arias De Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Sáenz De San Pedro B, Rodríguez R. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europea pollinosis. Int Arch Allergy Immunol. 2000;122(2): 101-7.

40. Ishizaka K, Newcomb RW. Presence of gammaE in nasal washings and sputum from asthmatic patients. *J Allergy* 1970;46(4):197-204.27.
41. Gould HJ, Takhar P, Harries HE, Durham SR, Corrigan CJ. Germinal-centre reactions in allergic inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27(10):446-52.
42. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Geavert P, Lambrecht BN. The who, where and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 635-45.
43. Campo P, Antunez C, Rondon C, Mayorga C, Garcia R, Ruiz M, et al. Positive bronchial challenges to *D. pteronyssinus* in asthmatic subjects in absence of systemic atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(suppl 2):AB6.



## TABLES AND FIGURE LEGENDS

Table 1.

Clinical characteristics and SPT responses to olive tree (OL) pollen extract and purified nOle e1 in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control subjects (CG).

\* $p < 0.05$  (LAR and CG vs. AR)

‡ $p < 0.05$  (AR vs. LAR and CG)

Table 2.

Serum total IgE and specific IgE determination to olive tree pollen (OL) and purified OL allergens nOle e 1, Ole e2, Ole e3, Ole e7, Ole e9 and Ole e11

IU/ml: international units per milliliter kU/L: kilounits per liter

Figure 1A.

Percentage of positive nasal allergen provocation test (NAPT) with olive tree pollen (OL) extract and purified nOle e1 in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control subjects (CG).

Figure 1B.

Percentage of nasal allergen provocation test (NAPT) obtained with the different doses of nOle e1 in allergic rhinitis (AR) and local allergic rhinitis (LAR) subjects.

Figure 2A.

Nasal allergen provocation test (NAPT) with nOle e1 in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control subjects (CG). Figure shows decrease of vol 2-6 cm values at different time points. The solid horizontal bar represents the cut-off point for a positive NAPT response (decrease of 30% of vol 2-6 cm).

Figure 2B.

Mean visual analogue scale (VAS) values after nOle e1 NAPT in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control subjects (CG). Values are represented at different time points after NAPT.

Figure 3A.

Levels of ECP in nasal lavages at 0, 15, 60 and 120 minutes after nOle e1 NAPT in AR, LAR and CG. \*  $p < 0.05$

Figure 3B.

Levels of tryptase in nasal lavages at 0, 15, 60 and 120 minutes after nOle e1 NAPT in AR, LAR and CG. \*  $p < 0.05$

Figure 4A.

Basophil activation test after adding OL and nOle e1 at different concentrations. The horizontal line indicates the cut-off point of the assay.

SI: stimulation index; OL: olive tree pollen extract; IgE C+: positive IgE control.

Figure 4B.

Positive responses of basophil activation test (BAT) in response to olive tree (OL) pollen extract and purified nOle e1 in allergic rhinitis (AR), local allergic rhinitis (LAR) and control subjects (CG).

**Table 1.**

	Age (y) Median (range)	Sex (F/M)	Smoking (%) (yes/no/ex)	Diagnosis of rhinitis(yr) Median(range)	Asthma Symptoms (%)	Positive SPT/ID OL (%)	Positive SPT nOle e1
<b>AR n=12</b>	33.09 (15-64)	9/3	0/83/17	8.5 (2-30)	66%	100% <sup>#</sup>	100% <sup>#</sup>
<b>LAR n=12</b>	38.15 (27.52)	6/6	17*/75/8	9.75 (3-20)	58%	0%	0%
<b>CG n=12</b>	37.6 (27-58)	9/3	17*/83/0	n/a	n/a	0%	0%

**Table 2.**

	Total IgE OL (IU/ml) Median (range)	sigE OL (kU/L) Median (range)	Serum sigE nOle e1 (% positive)	Serum sigE nOle e2 (% positive)	Serum sigE nOle e3 (% positive)	Serum sigE nOle e7 (% positive)	Serum sigE Ole e9 (% positive)	Serum sigE Ole e11 (% positive)
<b>AR n=12</b>	322.89 (12-909)*	12.9 (0.7-53.7)*	60%*	60%*	10%*	20%*	20%*	20%*
<b>LAR n=12</b>	26.17 (9-68)	<0.35	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>CG n=12</b>	13 (8-18)	<0.35	0%	0%	0%	0%	0%	0%

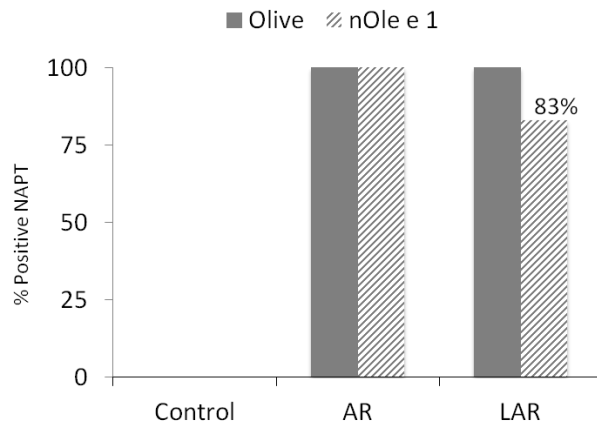


Figure 1A.

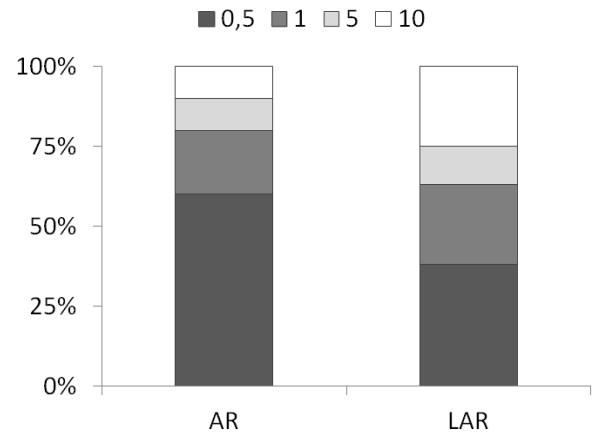


Figure 1B.

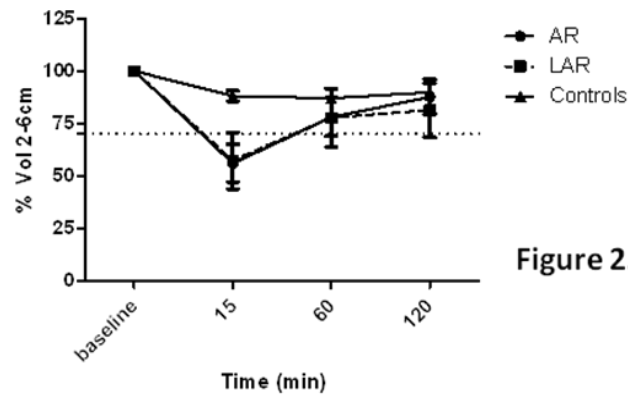


Figure 2.A

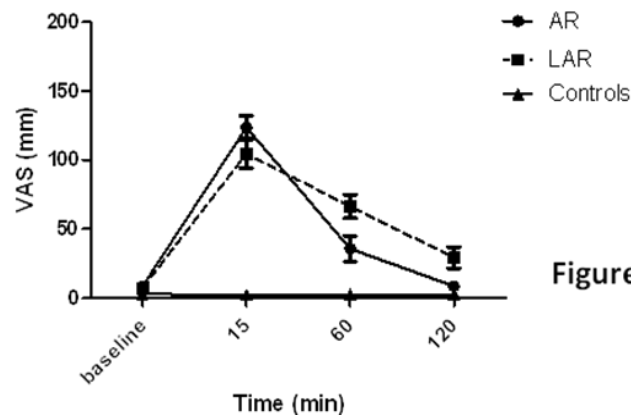


Figure 2.B

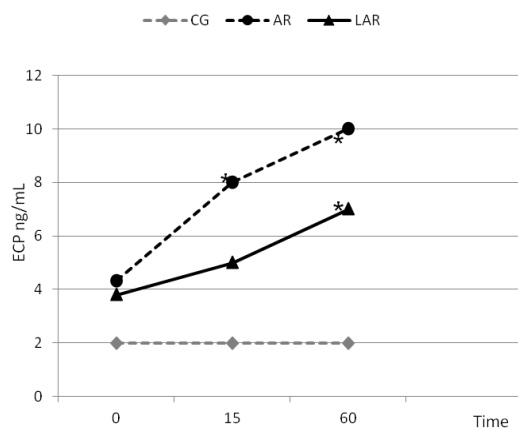


Figure 3.A

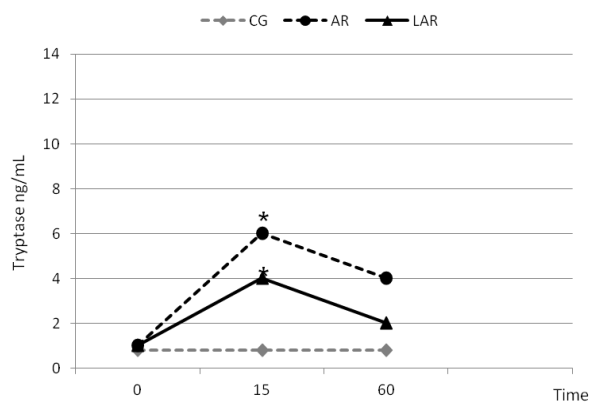


Figure 3.B

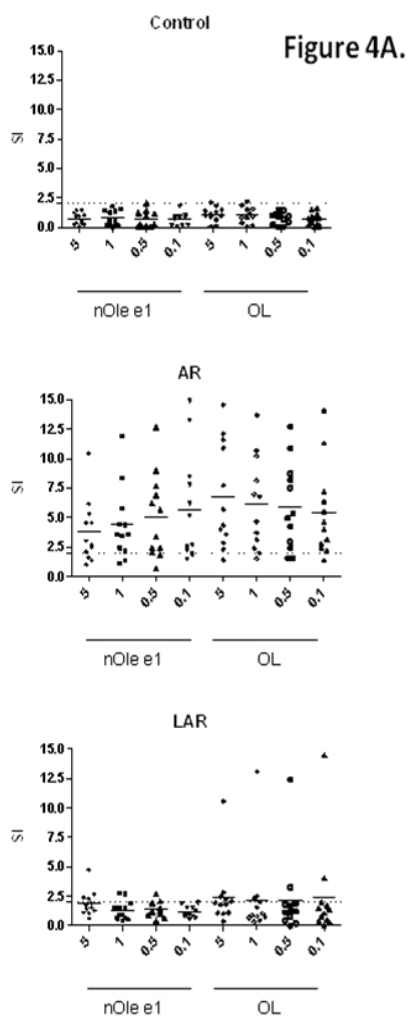


Figure 4A.

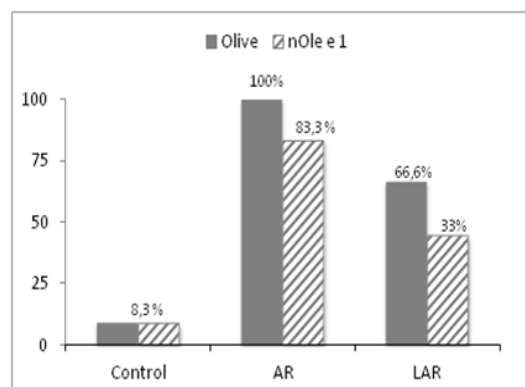


Figure 4B.

## DISCUSIÓN



La rinitis alérgica constituye un importante problema de salud a nivel mundial que afecta a sujetos de cualquier edad (Linneberg, 1999), siendo una causa significativa de deterioro en el rendimiento escolar y/o laboral en los sujetos afectados. Esta patología supone no solo una disminución importante de la calidad de vida de estos pacientes, sino que representa además un incremento sustancial de los gastos sanitarios (Magnussen H, 1993; Naclerio N, 1991; Wultrich B, 1995). Por lo tanto, el diagnóstico precoz de esta enfermedad es fundamental, puesto que mejoraría de forma significativa la evolución y el manejo clínico, incluyendo la identificación y evitación del alérgeno responsable así como su tratamiento (Fokkens WJ, 2002; Molgaard E, 2007).

Hasta hace pocos años, el diagnóstico de rinitis alérgica se basaba en una historia clínica sugestiva junto con una prueba cutánea mediante prick test y/o determinación de IgE sérica específica para alérgeno positiva (Bousquet J, 2008; van Rijswijk, 2005). Así, la rinitis era diagnosticada como no alérgica cuando se objetivaba un prick test negativo y la ausencia de IgE específica en suero, independientemente de los síntomas (Ng ML, 2000; Powe DG, 2003; Rondón, 2007; van Rijswijk, 2005). La RNA es un término que engloba a un grupo muy heterogéneo de entidades, que ha sido clasificada en el pasado en dos grandes subgrupos (RNA con o sin factor desencadenante conocido), siendo el NARES y la RI las más frecuentes dentro del subgrupo sin factor desencadenante conocido (Salib RJ, 2005; Settupane RA, 2003).

Desde el primer estudio realizado en los años 70 por Huggins y Brostoff (Huggins, 1975) en el que se objetivó la presencia de IgE a nivel local en la mucosa nasal de pacientes diagnosticados de RNA, han pasado muchos años sin apenas haberse realizado estudios similares, hasta que recientemente algunos investigadores han confirmado estos hallazgos en otras poblaciones de sujetos con RNA (Powe, 2001; Powe, 2003; Rondón, 2007; Rondón, 2008). Estos estudios han demostrado que un porcentaje de pacientes previamente diagnosticados de RNA o RI presentan en realidad una forma localizada de alergia en la mucosa nasal en ausencia de atopia sistémica por los métodos diagnósticos clásicos (prick test e IgE sérica específica negativos),



denominada RAL (Rondón, 2009) o “entopia” (Powe, 2003). Con los resultados obtenidos en estos trabajos se concluye que para diagnosticar correctamente a los pacientes de rinitis alérgica, el empleo de las pruebas cutáneas y la determinación sérica de IgE específica para alérgeno puede ser insuficiente. Así lo demuestran resultados obtenidos de varios de estos estudios, en los que un número significativo de pacientes (47-62.5%) que presentaban clínica de rinitis alérgica, tanto estacional (Rondón, 2008; Rondón, 2009; Wedbäck, 2005) como perenne (Carney, 2002; Rondón, 2007; S. López, 2010) y que previamente habían sido diagnosticados de RI o RNA, fueron finalmente diagnosticados de RAL, mediante una respuesta positiva al TPN con alérgeno y/o IgE específica nasal.

Los datos obtenidos de estos estudios han permitido describir las principales características fisiopatológicas de la RAL, que incluyen la presencia de una respuesta positiva al TPN específico con alérgenos (Carney, 2002; Rondón, 2007; Rondón, 2008; Wedbäck A, 2005), un patrón inflamatorio nasal tipo Th2 (Powe, 2001; Powe, 2003; Powe, 2004; Rondón, 2007; Rondón, 2008), la producción local de IgE específica para alérgenos (Huggin y Brostoff, 1975; Rondón, 2007; Rondón, 2008) e incremento de mediadores inflamatorios a nivel nasal (López, 2010; Rondón, 2009).

Estos hallazgos han demostrado que la RAL es una enfermedad no caracterizada en el pasado, lo que ha motivado la aparición de una nueva clasificación etiológica de la rinitis (Rondón C, 2012), donde RAS y RAL quedan definidas como entidades diferenciadas y agrupadas a su vez según el tiempo de exposición al alérgeno (clasificación clásica) y según la duración y severidad de los síntomas (clasificación ARIA) (Bousquet J, 2008). Recientemente, Rondón y col. realizaron el primer estudio observacional de corte transversal para estimar la prevalencia, definir el fenotipo y la relevancia clínica de esta nueva entidad (Rondón C, 2012). La prevalencia de la RAL fue del 25.7%, la de RAS 63.1% y la de RNA 11.2%, con una prevalencia total de RA (local y sistémica) del 88.8%. El diagnóstico diferencial entre RAL y RNA se realizó mediante TPN. Un hallazgo importante en este estudio fue que más del 36% de los

pacientes con RAL confirmada habían comenzado a presentar síntomas durante la infancia (edad  $\leq 14$  años). Por tanto, podemos afirmar que la RAL es una entidad frecuente, que puede afectar a uno de cada cuatro pacientes con rinitis, que se presenta principalmente en adultos jóvenes y puede iniciarse en la infancia.

Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial correcto entre RA (con y sin atopia sistémica) y RNA. En este sentido, dado que en los sujetos con RAL no se demuestra una respuesta IgE mediada con los tests convencionales (prick test e IgE sérica específica negativos), el diagnóstico se basa exclusivamente en una respuesta positiva al TPN con alérgeno y/o demostración de síntesis local de IgE (Carney, 2002, Huggins y Brostoff, 1975; Rondón, 2012). Teniendo en cuenta estos resultados, en 2010 Rondón y col. (Rondón, 2010) propusieron un nuevo protocolo diagnóstico de rinitis alérgica, recomendando la realización del TPN y determinación de IgE específica nasal en pacientes con historia clínica de rinitis alérgica, en los que el prick test y la determinación de IgE específica en suero resulten negativos o discordantes con la historia clínica. No obstante, el TPN es una técnica que no está disponible en todos los centros, necesita de personal entrenado para su realización y consume mucho tiempo y recursos. Recientemente se ha desarrollado un nuevo protocolo de TPN con múltiples alérgenos administrados de forma secuencial en una única sesión (TPN-M) (Rondón, 2011), que ha permitido reducir en gran medida el tiempo de realización y ha demostrado ser útil, con una alta sensibilidad y especificidad y altamente reproducible para el diagnóstico de pacientes con RAL (López, 2010; Rondón, 2007; Rondón, 2008; Rondón 2009). De forma comparativa, la determinación nasal de IgE específica aporta ventajas, ya que es una técnica no invasiva y con una elevada especificidad (López, 2010; Rondón 2007). Sin embargo, presenta una baja sensibilidad para los alérgenos estudiados (22% de IgE específica positiva para ácaros en lavados nasales) (Rondón, 2007).

Los inconvenientes que presenta la realización del TPN y la baja sensibilidad aportada por la determinación local de IgE específica para alérgeno para el despistaje de

pacientes con RAL, ha motivado la necesidad de la aplicación de otras técnicas diagnósticas complementarias que nos permitan evaluar al mayor número de estos pacientes, manteniendo la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del TPN, que es por el momento el procedimiento “gold standard” para el diagnóstico de pacientes con RAL (López, 2010; Rondón, 2007; Rondón, 2008; Rondón 2009). Es por tanto de la mayor importancia investigar otras alternativas diagnósticas que se puedan realizar de forma más universal. Entre ellas, los test *in vitro* representan una alternativa no invasiva que puede contribuir a un mejor diagnóstico de estos pacientes.

Los basófilos son células clave en la respuesta alérgica y están involucrados en la respuesta alérgica inmediata mediada por IgE (Schroeder JT, 2009), por lo que se han desarrollado diversos test para evaluar la presencia de los basófilos periféricos activados y su respuesta a los alérgenos. El TAB es una técnica validada para el diagnóstico *in vitro* de sensibilización a diversos aeroalérgenos (Ebo DG, 2004; Pâris-Köhler A, 2000; Sanz ML, 2001; Saporta M, 2001), además de para el veneno de himenópteros (Sainte-Laudy J, 2000), y algunos medicamentos (Gamboa PM, 2004; Gómez E, 2009; Monneret G, 2002; Sanz ML, 2002; Sanz ML, 2005; Torres MJ, 2004). Además, ha demostrado ser un test reproducible con una sensibilidad y especificidad elevadas para algunos alérgenos (Pâris-Köhler, 2000). Sin embargo, estos resultados se han obtenido en pacientes con RAS, no habiéndose investigado aún el uso potencial del TAB en la identificación de pacientes con RAL, en los que hasta el momento sólo hemos podido demostrar respuesta IgE a nivel local (TPN con alérgeno positivo y/o IgE específica nasal demostrada).

Por tanto, con el primer artículo de esta tesis nos propusimos evaluar la presencia de activación alérgeno-específica de basófilos mediante la técnica de TAB en sujetos con RAL producida por DP, comparando los resultados con pacientes con RA clásica por DP, con atopia sistémica, y con sujetos con RNA y sanos sin atopia. Para este estudio se seleccionó una muestra de 55 sujetos, 16 RAL y 14 RAS, comparados con un grupo control formado por 10 RNA y 15 sujetos sanos sin rinitis. La mayoría de

pacientes con RAS y RAL eran mujeres jóvenes con un patrón similar de síntomas nasales en frecuencia y severidad (clínica perenne persistente moderado-grave), de al menos 5 años de evolución, y con conjuntivitis (88%) y asma (>30% de los casos) como comorbilidades asociadas más frecuentes. Estos datos son similares a los observados previamente en otros estudios (Gómez F, 2011; Rondón C, 2009; Rondón C, 2012), indicando que RAS y RAL son clínicamente similares. Siguiendo las últimas recomendaciones para el diagnóstico de los pacientes con RAL (Rondón C, 2010), realizamos TPN con DP en todos los grupos, siendo positivo y confirmando el diagnóstico de rinitis alérgica por DP en el total de pacientes RAS y RAL, y negativo en el resto de sujetos. Previamente, se realizó prueba cutánea mediante prick test con un panel de aeroalérgenos más prevalentes en nuestro ámbito de estudio y fue positiva a DP en todos los pacientes RAS y negativa en el resto de sujetos. En éstos, se realizó además prueba cutánea mediante intradermorreacción (ID) con DP para confirmar la negatividad cutánea. Así mismo, se testó IgE sérica específica mediante CAP con la misma batería de alérgenos en prueba cutánea, siendo positiva a DP (>0.35 kU/L) en todos los sujetos con RA clásica y negativa (<0.35 kU/L) en todos los sujetos RAL así como en todos los sujetos con RNA y en sujetos sanos sin rinitis.

Posteriormente, a todos los sujetos de nuestro estudio se les realizó el TAB con DP. Los resultados mostraron una positividad del TAB para dicho alérgeno en el 85% (11/13) de los sujetos RAS y en el 50% (8/16) de los sujetos RAL, siendo negativo en sujetos de los grupos control (salvo en un paciente con RNA, 1/10 (10%) y en otro paciente del grupo control sin rinitis, 1/14 (7%)). Además, para determinar la respuesta IgE alérgica específica, se realizó el TAB con WM en un subgrupo de 4 pacientes con RAL por DP elegidos de forma aleatorizada. La WM es un inhibidor de la fosfatidilinositol-3 quinasa, que participa en la vía de transducción de señal responsable de la secreción de histamina después de la estimulación del receptor de IgE de alta afinidad (Ali K, 2004; Knol EF, 1991; Yano, 1993), de tal manera que su empleo antes de la exposición de la muestra al alérgeno permite demostrar una estimulación del basófilo mediada por

IgE específica para alérgeno. Las respuestas positivas de las 4 muestras de sujetos RAL que se sometieron a TAB con WM se negativizaron cuando este inhibidor se añadió al ensayo, demostrándose el mecanismo IgE mediado de la activación alérgeno-específica de basófilos en sujetos con RAL por DP.

En nuestro trabajo el TAB con DP en los sujetos RAS mostró una elevada sensibilidad (85%) y especificidad (93%), siendo la sensibilidad del 50% para el grupo de pacientes RAL con la misma especificidad (93%), por lo que podemos afirmar con estos resultados que la mitad de los pacientes con RAL por DP pueden ser identificados mediante TAB, en contraste con la baja sensibilidad de otros métodos como la determinación de IgE específica en lavado nasal (22% para ácaros) (Rondón, 2007).

Además, el TAB con DP en los pacientes con RA clásica mostró una buena concordancia con el TPN ( $p=0.0001$ ), siendo significativa para el grupo de sujetos RAL ( $p=0.01$ ) (Landis, Biometrics 1997). El valor predictivo positivo (VPP) analizado para todos los sujetos RAS y RAL mostró cifras elevadas (92% y 89% respectivamente) y el valor predictivo negativo (VPN) fue del 87% para el grupo de RA clásica y algo inferior (62%) para el grupo de pacientes RAL. Por tanto, podemos afirmar que el empleo del TAB ayuda a confirmar el diagnóstico de los pacientes con rinitis alérgica, tanto si presentan o no atopía sistémica según los test diagnósticos empleados hasta ahora.

El hallazgo de resultados positivos en el TAB plantea la cuestión de si la RAL y la RA clásica son entidades clínicas independientes o por el contrario la RAL es un primer escalón en la evolución natural hacia una alergia respiratoria (RAS y/o asma alérgica), puesto que este estudio detecta IgE específica en basófilos periféricos. En este sentido, existen algunas evidencias en la literatura que evalúan esta posibilidad. Un reciente estudio piloto demostró que el 40% de los sujetos con RAL que fueron tratados con IT con polen de gramíneas desarrollaron una respuesta positiva en prick test a los 6 meses y tuvieron IgE sérica específica positiva a *lolium* y *phleum* a los 12 meses de tratamiento (Rondón, 2011). Posteriormente, Rondón y col. publicaron en 2013 (Rondón, 2013) los resultados preliminares de los primeros 5 años de un estudio

prospectivo a 10 años de seguimiento en el que se analizó la evolución de 194 pacientes con RAL confirmada mediante TPN positivo con al menos un aeroalérgeno (DP, Alternaria, olivo o mezcla de gramíneas) y 130 sujetos control sin rinitis. Todos los sujetos fueron revisados anualmente mediante cuestionario demográfico y clínico, espirometría, prueba cutánea mediante prick test y determinación de IgE sérica específica. La mayoría de los pacientes con RAL eran mujeres no fumadoras, con clínica de rinitis perenne persistente moderada-grave, con historia familiar de atopia y residentes en ambiente urbano. Una evaluación inicial de los pacientes mostró que la conjuntivitis (51%) y el asma (18,8%) eran las comorbilidades asociadas más frecuentes y DP el principal aeroalérgeno detectado en el TPN (51%). Los hallazgos de nuestro trabajo son similares a los de este estudio. Los resultados obtenidos tras los primeros 5 años de seguimiento mostraron un aumento de la aparición de conjuntivitis (7,9%) y asma (5,6%) como principales comorbilidades asociadas. Además, se evaluaron datos de atopia sistémica tanto en pacientes con RAL como en sujetos control, encontrándose una aparición similar de nuevas positividades en prick y/o IgE específica en suero para alérgenos en ambos grupos (LAR: 12/176,6.8%; sujetos control: 6/115,5.2%,  $p>0.05$ ). Estos resultados, pendientes de confirmar en el estudio a los 10 años de seguimiento, muestran que una proporción tanto de sujetos RAL como controles desarrollaron atopia sistémica sin diferencias significativas entre grupos, sugiriendo que la RAL y la RA clásica pueden ser dos entidades bien definidas.

En nuestro primer estudio se ha evidenciado que más del 30% de los sujetos con síntomas nasales también presentan síntomas de vía respiratoria baja. En este sentido, diversas investigaciones se han encaminado a evaluar la producción local de IgE específica en otras enfermedades respiratorias aparentemente no alérgicas como el asma, la rinosinusitis crónica o la conjuntivitis. En la literatura existe una amplia evidencia de la síntesis local de IgE específica en la mucosa bronquial en el asma atópica y no atópica (Humbert M, 1996; Taknar P, 2007; Ying S, 2000), sugiriendo que la IgE

puede ser importante en el asma considerado no atópico y que ésta puede generarse en la mucosa bronquial, tal y como ocurre en la mucosa nasal de pacientes con RAL. Recientemente, Mouthuy y col. demostraron la producción local de IgE en pacientes con asma no atópica y la capacidad de esta IgE para reconocer alérgenos de DP (Mouthuy J, 2011). Sin embargo, los autores no pudieron demostrar una respuesta clínica a la exposición de este alérgeno en estos mismos pacientes. En nuestra población de sujetos con RAL, el posible papel de los alérgenos en los síntomas bronquiales que presentan los sujetos con RAL no está aun suficientemente estudiado. Campo y col. (Campo y col., 2011) han observado respuestas bronquiales positivas a DP mediante el test de provocación bronquial (TPB) en 8/16 pacientes con RAL confirmada. El análisis de esputo inducido después del TPB en estos pacientes reveló aumentos similares de los eosinófilos y ECP en los pacientes con RAL y controles, aumentando la evidencia de un posible equivalente de RAL en las vías respiratorias inferiores. No obstante, son necesarios más estudios en esta línea de investigación que proporcionen en el futuro nuevas evidencias de la producción local de IgE a nivel bronquial y el papel de ésta en la fisiopatología de la enfermedad.

En nuestro primer estudio también es interesante el hecho de que los sujetos con RAL mostraron distintivamente niveles de IgE sérica total  $<100$  UI/ml (media: 21UI/ml, rango: 4-131 UI/ml), como se ha observado en otros estudios (López, 2010; Rondón 2007; Rondón 2009; Rondón 2011). Sin embargo, en sujetos con RAS la IgE total fue significativamente superior (media: 247UI/ml, rango: 53-4010 UI/ml). Estos niveles séricos bajos de IgE total en sujetos con RAL pueden significar que la IgE total periférica puede existir en muy pocas cantidades en suero y por lo tanto no ser detectada con los ensayos clásicos o que la IgE específica puede estar solo presente en tejidos o superficie celular. En una reciente revisión de Dullaers y col. (Dullaers, 2012), los autores afirman que la mucosa nasal podría ser la primera localización donde se produce IgE específica para alérgeno, y sugieren que algunos sujetos no atópicos son en realidad atópicos, pero existe un déficit de migración de la IgE desde la mucosa

nasal a la circulación en estos sujetos. En nuestro estudio se detectó IgE alérgeno-específica en la superficie del basófilo de algunos de los pacientes RAL. Esto sugiere que después de la producción local de IgE específica, el basófilo podría ser la primera célula que fije IgE específica, antes de la detección de IgE sérica libre y sensibilización de mastocitos cutáneos.

Por tanto, nuestro primer trabajo representa la primera evidencia de atopia sistémica en pacientes con RAL mediante la demostración de activación de basófilos por un mecanismo mediado por IgE específico para alérgeno en la mitad de los sujetos estudiados (sensibilidad del 50%), representando el TAB una técnica más sensible que la determinación de IgE específica en lavado nasal (sensibilidad del 22% para DP), con elevada especificidad (93%), reproducible y con una significativa concordancia con el TPN ( $p=0.01$ ), consumiendo menos tiempo.

Sin embargo, uno de los problemas de este trabajo radica en que estos ensayos se realizaron en un pequeño grupo de estudio, constituyendo un estudio piloto que precisa de confirmación en grupos poblacionales más amplios. Así, los objetivos de nuestro segundo artículo fueron evaluar la presencia de activación alérgeno-específica de basófilos mediante el TAB en una amplia población de sujetos con RAL y RA clásica, así como determinar la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y correlación del TAB con el TPN en ambos grupos de estudio.

Para ello, se seleccionó una muestra mayor que la del primer trabajo, con un total de 86 sujetos, de los que 30 eran pacientes con RAL y 32 RAS, comparados con un grupo control de 10 RNA y 14 sujetos sanos sin rinitis. Al igual que en nuestro primer trabajo y salvo los sujetos sanos, eran pacientes con clínica de rinitis de al menos 2 años de evolución, la mayoría mujeres jóvenes y con asma (37%) y conjuntivitis (77%) como comorbilidades asociadas más frecuentes. Del mismo modo, el diagnóstico de rinitis alérgica a DP en los pacientes RAL se confirmó mediante TPN, que fue también positivo para los pacientes RAS y negativo en el resto de sujetos del estudio. Previamente también se realizaron pruebas cutáneas mediante prick test e ID y



determinación sérica de IgE específica mediante CAP en todos los grupos, siendo positivas a DP (tanto PC como IgE específica) en los pacientes RAS y negativas en el resto de sujetos. Así mismo, a todos se les realizó TAB con DP siguiendo los protocolos utilizados en el primer estudio.

Los resultados obtenidos en este segundo estudio, en el que se dobla el número de sujetos RAS y RAL a los que se realiza el TAB, permiten confirmar los resultados obtenidos en el estudio piloto. Concretamente, el TAB con DP fue positivo en 14 de los 30 pacientes con RAL (46.7%) y 29/32 pacientes RAS (90.6%). En los grupos control también encontramos algunas respuestas positivas en el TAB con DP (2/10, 20% en sujetos RNA y 1/14, 7% en sujetos sanos sin rinitis). Cuando analizamos la especificidad de la técnica, el TAB con DP mostró cifras elevadas para ambos grupos (92.3% RAS, 93% RAL), así como un alto VPP (96.7% RAS, 93.3% RAL). Además, la concordancia entre el TAB y el TPN con DP en los pacientes RAS y RAL fue similar a la encontrada en el primer trabajo (RAS: kappa index= 0.8,  $p < 0.0001$ ; RAL: kappa index  $< 0.3$ ,  $p < 0.01$ ). Estos datos confirman que el empleo del TAB puede apoyar el diagnóstico de pacientes con RAL por DP. Sin embargo, y como ya ocurrió en nuestro primer trabajo, la sensibilidad y el VPN de la técnica no fueron muy elevados en los sujetos RAL (46.7% y 44.8% respectivamente). Por lo tanto, siguen haciendo falta más estudios en el futuro que ayuden a mejorar la sensibilidad de la técnica y así poder diagnosticar al mayor número de pacientes con RAL a DP, posiblemente mediante la utilización de dosis mayores de alérgeno que no alteren la especificidad presente del TAB.

No obstante, el hecho de que algunos de los pacientes RAL en ambos trabajos presenten una respuesta alérgeno específica positiva en el TAB plantea preguntas interesantes sobre el mecanismo que puede causar este fenómeno, ya que el hecho de objetivar IgE específica en la superficie de los basófilos en estos pacientes está en conflicto con la definición de RAL como una entidad con ausencia de atopia sistémica. Las células plasmáticas productoras de IgE se localizan en los folículos linfoides en las

vías respiratorias y gastrointestinales (Tada T, 1970). Algunos autores han demostrado que la concentración de IgE es mayor en los lavados nasales que en el suero en pacientes con asma (Ishizaka K, 1970), independientemente de tener una prueba cutánea positiva o negativa. Otro estudio reveló que el 70-80% de la IgE total es sintetizada localmente en el órgano afecto, representando los niveles séricos el resto de la secreción (Deuschl H, 1974), lo que implica que la IgE local y sistémica pueden tener características diferentes en los dos compartimentos. Por lo tanto, existen pruebas de que la mucosa respiratoria es un lugar importante de la síntesis de IgE, y que la mayor parte de ésta permanece adherida a sus receptores de alta y de baja afinidad a nivel local, y que la IgE circulante representa sólo un porcentaje de su secreción total (Dullaers M, 2012; Gould HJ, 2006; Huggins KG, 1975; Platts-Mills TA, 1979; Powe DG, 2010). Sin embargo, el tráfico de las células que expresan la IgE y el intercambio de anticuerpos IgE entre la mucosa nasal, la circulación general y la médula ósea sigue siendo un problema hoy en día.

Las respuestas positivas al TAB en sujetos RAL son mediadas por IgE según demuestra el test de wortmanina. Sin embargo, no se puede descartar que existan otros mecanismos que puedan producir respuestas positivas en algunos pacientes e incluso en los controles. Algunos alérgenos pueden ser capaces de producir una activación no específica de los basófilos (por proteasas u otras causas) en algunos sujetos susceptibles con un fenotipo de basófilos "liberador" (Nguyen KL, 1990). Sin embargo, en este estudio existe una elevada concordancia entre la positividad del TPN con DP y las respuestas positivas en el TAB con el mismo alérgeno, con una alta especificidad tanto en los sujetos RAS como RAL (92,3% y 93% respectivamente). Además, como se ha mencionado anteriormente, los experimentos realizados previamente con wortmanina confirmaron el hecho de que esta respuesta es específica para alérgeno. Existe también la posibilidad de que otros mecanismos potenciales dependientes de IgE jueguen algún papel en estas respuestas en los

basófilos, como la participación de superantígenos o cadenas ligeras libres (Powe DG, 2010; Salib RJ, 2008).

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia, por tanto, de realizar un diagnóstico correcto en aquellos casos en los que existe discordancia entre la sospecha clínica y los resultados obtenidos mediante pruebas complementarias. A pesar de la amplia evidencia de la importancia de la producción local de IgE alérgeno-específica, las pruebas cutáneas y la detección en suero de IgE específica para los alérgenos comunes en cada área geográfica todavía se utilizan en la práctica clínica para el diagnóstico, obteniéndose en algunos casos falsos negativos. En esos casos, la exploración del órgano diana por medio de TPN con los alérgenos sospechosos puede ayudar a distinguir entre los pacientes con RAL y RNA. En los casos en los que esté disponible, el TAB puede constituir una alternativa para apoyar el diagnóstico en este tipo de pacientes.

Además de los ácaros del polvo, otros alérgenos relevantes en nuestro medio son los pólenes, y en nuestra región más concretamente, uno de los alérgenos más importantes es el polen de olivo. La alergia al polen del olivo (*Olea europea*) es una enfermedad compleja, influida tanto por factores ambientales como genéticos (Aguerri, 2013; Cárdbaba B, 2007; Llanes E, 2009; Quiralte J, 2007), y representa una de las más importantes causas de alergia respiratoria en las costas mediterráneas así como en algunas áreas del norte de América (Barber D, 2008). La exposición al polen de olivo causa síntomas naso-conjuntivales, así como exacerbaciones del asma entre finales de abril y principios de junio.

En los dos primeros trabajos pudimos observar una respuesta positiva al TAB con DP en sujetos RAL, demostrándose además que la estimulación de los basófilos en estos pacientes era específica para DP y por un mecanismo IgE mediado. Sin embargo, estos ensayos sólo se han realizado con los ácaros del polvo y no se han probado con otros alérgenos como el polen.

Varios alérgenos se han caracterizado en el polen del olivo, muchos de los cuales muestran homología de secuencia con las proteínas de diferentes tejidos vegetales (Quiralte J, 2007; Rodríguez R, 2001; Villalba M, 2014). De todos ellos, destaca el Ole e 1, que es la proteína más abundante de los extractos de polen de olivo, constituyendo hasta el 20% del contenido total del extracto y constituye uno de los principales alérgenos del polen del olivo, con una frecuencia de unión a IgE de casi el 80% entre los pacientes con polinosis por dicho polen (Palomares Q, 2006; Rodríguez R, 2002). La estructura y las características de Ole e 1 se han estudiado a fondo y constituye un interesante modelo de alérgeno purificado (González EM, 2006; Huecas S, 1999; Martín-Orozco E, 1994; Villalba M, 1993; Villalba M, 1994). Varios estudios se han realizado en los últimos años con el uso de formas naturales y recombinantes de Ole e1, como la medición de IgE específica (van Ree R, 2000), pruebas cutáneas (Quiralte J, 2000), estudios genéticos (Aguerrí, 2013; Cárdena B, 2007; Llanes E, 2009) y ensayos de liberación de histamina (Batanero B, 1999). Algunos autores han utilizado el extracto completo de olivo para llevar a cabo estudios nasales en su mayoría con fines diagnósticos (Liccardi G, 1997; Unsel M, 2009). Hasta la fecha, no existe ningún trabajo en el que estudie de forma exhaustiva la respuesta nasal y periférica al alérgeno purificado Ole e1 de los sujetos con rinitis. Por tanto, con nuestro tercer trabajo nos planteamos evaluar las respuestas *in vivo*, mediante pruebas cutáneas y TPN, a un alérgeno mayoritario purificado prevalente en nuestro medio, utilizando como alérgeno modelo el Ole e1 nativo (nOle e1) en un grupo de pacientes con RAS y RAL a olivo confirmada mediante TPN con extracto completo, así como evaluar *in vitro* la presencia de activación alérgeno-específica de basófilos mediante el TAB en sujetos con RAL producida por dicho polen utilizando tanto extracto completo de olivo como nOle e1 purificado.

Para ello, se seleccionó una población de 36 sujetos ,12 RAS y 12 RAL, comparados con 12 sujetos control. Salvo el grupo control que eran sujetos sanos sin rinitis, la mayoría eran mujeres jóvenes no fumadoras que referían síntomas de rinitis de al menos 5 años de evolución, siendo el asma la comorbilidad más frecuente asociada

(66% de los RAS y el 58% de los RAL). La rinitis alérgica a olivo se confirmó mediante TPN con el extracto completo, siendo negativo en el grupo control. Como en los estudios anteriores, los pacientes con RAS mostraron además una respuesta positiva en la prueba cutánea y en la determinación sérica de IgE específica para dicho extracto ( $>0.35$  kU/L), siendo ambas pruebas negativas en todos los sujetos del grupo RAL así como en los controles.

Para evaluar las respuestas *in vivo* con nOle e1 purificado se realizaron pruebas cutáneas (prick test e ID) y TPN, a las concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . La respuesta fue monitorizada mediante rinometría acústica y escala visual analógica (EVA) de recogida de síntomas. Además, se analizaron los niveles de mediadores inflamatorios (ECP y triptasa) antes y varios tiempos después de la provocación nasal con alérgeno. Además, se evaluaron respuestas *in vitro* mediante la determinación de IgE específica a nOle e1 así como a otros alérgenos purificados del olivo (nOle e2, e3, e7, e9 y e11) mediante ELISA, también antes y después de la realización del TPN. Así mismo, a todos los sujetos del estudio se les realizó TAB con extracto de olivo completo y con nOle e1 purificado (0.1, 0.5, 1 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Los resultados mostraron que todos los sujetos del grupo RAS (12/12, 100%) reconocieron a nOle e1 en prueba cutánea y presentaron una respuesta positiva al TPN con dicho extracto, mientras que los sujetos control presentaron negatividad tanto en prueba cutánea como en el TPN con nOle e1. En cambio, el 83% (10/12) de los RAL presentó positividad en el TPN con dicho extracto, demostrándose por primera vez la respuesta a un alérgeno purificado con alergenidad conocida en este grupo de pacientes.

Tal y como se ha observado en estudios previos (López, 2010; Rondón, 2009), en nuestro trabajo los niveles de ECP en lavado nasal fueron significativamente elevados a los 15, 60 y 120 minutos tras TPN en ambos grupos (RAS y RAL), comparados con el grupo control ( $p<0.05$ ). Así mismo, los niveles de triptasa en lavado nasal se elevaron a los 15 minutos tras el TPN, con una disminución a los 120 minutos después de la

prueba. Otro dato observado es que, en general, los sujetos RAL requieren dosis más altas de nOle e1 para obtener una respuesta positiva en la mucosa nasal, aunque son dosis máximas toleradas por los controles, que no provocan obstrucciones nasales, síntomas o liberación de mediadores en dicho grupo.

Como se describió en trabajos anteriores, la media de la IgE total fue 322,9 UI / ml en sujetos RAS, mientras que los sujetos RAL mostraron bajos niveles de IgE total, similares a los controles. Sólo los sujetos con RA clásica mostraron niveles séricos de IgE específica (el 60% para nOle e1 y nOle e2, seguido de nOle e 7, nOle e9 y nOle e11 (20%) y nOle e 3 (10%)) como era de esperar.

Los 12 pacientes RAS presentaron el TAB positivo con extracto completo de olivo y 10/12 (83%) con nOle e1; en los sujetos RAL, el 66.6% (8/12) de los pacientes RAL tuvo un TAB positivo con extracto completo de olivo y un porcentaje inferior (33%, 4/12) lo presentaron con nOle e1. Solo un sujeto del grupo control (8%) mostró una respuesta positiva al TAB con ambos extractos.

Estos resultados son similares a los obtenidos en los estudios previos realizados con un alérgeno perenne (DP), confirmándose la presencia de IgE alérgeno específica en la superficie de los basófilos en pacientes con RAL por un alérgeno estacional del polen de olivo, lo que sugiere que esta célula puede ser la receptora de la IgE específica que emigra desde la nariz o desde otros órganos (Gould HJ, 2006; Ishizaka K, 1970). Sin embargo, tal y como se expuso con anterioridad, este hecho contrasta con la definición de RAL como una entidad con ausencia de atopia sistémica evaluada por los métodos diagnósticos convencionales. Por otra parte, el mecanismo exacto que pueda causar este fenómeno y cómo se produce el intercambio de anticuerpos de IgE entre la mucosa nasal y la circulación general todavía sigue sin estar claro (Dullaers M, 2012). Otro estudio interesante en el futuro será la provocación bronquial con extracto completo de olivo y nOle e1 purificado en estos sujetos, ya que algunos estudios preliminares han demostrado que los pacientes con RAL a DP y síntomas bronquiales

también muestran respuestas positivas a la prueba de provocación bronquial específica con dicho alérgeno (Campo P, 2011).

En conclusión, estos estudios demuestran que los pacientes con RAL tienen IgE alérgeno-específica en la superficie de los basófilos periféricos, y que el TAB es un método de alta especificidad que apoya el diagnóstico de RAL, junto al TPN y la determinación local de IgE específica. Así mismo, este fenómeno ha sido demostrado tanto con un alérgeno perenne del ácaro del polvo como con un alérgeno estacional del polen del olivo, ambos altamente prevalentes en nuestro ámbito de estudio, existiendo además respuestas positivas tanto a extractos completos como a alérgenos mayores purificados, como nOle e1. Hacen falta en el futuro estudios que evalúen nuevos alérgenos, así como formas de implementar y mejorar la sensibilidad y el rendimiento de esta técnica para el diagnóstico de la RAL.

## CONCLUSIONES





1. Un porcentaje de los pacientes con rinitis alérgica local (RAL) por sensibilización a *D. pteronyssinus* (DP) sin evidencia de atópica sistémica por los métodos diagnósticos convencionales presentan activación alérgeno-específica de los basófilos periféricos evaluado mediante la técnica del test de activación de basófilos (TAB).
2. La respuesta a DP observada en los basófilos periféricos de los pacientes con RAL es mediada por IgE, como se demuestra mediante la negativización del TAB tras su tratamiento con Wortmanina.
3. El TAB con DP presenta una sensibilidad del 50%, con una elevada especificidad y valor predictivo positivo para identificar a sujetos con RAL confirmado en una amplia población de sujetos.
4. El TAB con DP presenta una excelente concordancia con el TPN con DP en pacientes con rinitis alérgica (RA), siendo esta concordancia moderada para el grupo de pacientes con RAL por DP.
5. Existe activación alérgeno-específica de basófilos mediante la técnica de TAB en sujetos con RAL tras la estimulación con polen de olivo, en porcentaje similar al detectado con ácaros del polvo.
6. La respuesta al TPN con nOle e1 es positiva en el 100% de los sujetos con RA y en el 83% de los sujetos RAL con sensibilización a polen de olivo confirmada mediante TPN con olivo completo.
7. La monitorización de marcadores inflamatorios (ECP y triptasa) tras TPN en sujetos con RAS y RAL demuestra aumento de los mismos tras la provocación nasal con nOle e1 en sujetos con RAS y RAL pero no en controles.
8. Existe activación alérgeno-específica de basófilos mediante la técnica de TAB tras la estimulación con nOle e1 en un 83% de sujetos RAS y 33% de sujetos RAL.



## BIBLIOGRAFÍA



## **A**

**Aas K**, Aberg N, Bachert C, Bergmann K, Bergmann R, Bonini S et al. Epidemiology: Prevalence of allergic diseases. En: The UCB Institute of Allergy, eds. European Allergy White Paper. Bruxelles:AVISO sprl; 1997, 14-47.

**Abbas A.K.**, Lichtman A.H. y Pillai S. (2012). Cellular and Molecular Immunology, 7<sup>th</sup> edition.

**Aguerri M**, Calzada D, Montaner D, Mata M, Florido F, Quiralte J, Dopazo J, Lahoz C, Cardaba B. Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. J Biol Regul Homeost Agents. 2013;27(2):337-50

**Ali K**, Bilancio A, Thomas M, Pearce W, Gilfillan AM, Tkaczyk C, Kuehn N, Gray A, Giddings J, Peskett E, Fox R, Bruce I, Walker C, Sawyer C, Okkenhaug K, Finan P, Vanhaesebroeck B. Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. Nature. 2004 Oct 21;431(7011):1007-11.

**Annesi-Maesano I**, Oryszczyn MP, Neukirch F, Kauffmann F. Relationship of upper airway disease to tobacco smoking and allergic markers: a cohort study of men followed up to 5 years. Int Arch Allergy Immunol 1997;114:193-201.

**Annesi-Maesano I**, Didier A, Klossk J, Guillet G, Chanal I, Matthieu J, et al. Development and validation of a diagnostic criteria score for allergic rhinitis for use in epidemiological studies. Hospital validation. Eur Respir J 1998;10:143S.

**Aranda A**, Mayorga C, Ariza A, Doña I, Blanca-Lopez N, Canto G, Blanca M, Torres MJ. IgE-mediated hypersensitivity reactions to methylprednisolone. *Allergy*. 2010 Nov;65(11):1376-80. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02386.x. Epub 2010 Jun 16.

**Aranda A**, Mayorga C, Ariza A, Doña I, Rosado A, Blanca-Lopez N, Andreu I, Torres MJ. In vitro evaluation of IgE-mediated hypersensitivity reactions to quinolones. *Allergy*. 2011 Feb;66(2):247-54. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02460.x. Epub 2010 Aug 17.

**Ariza A**, Fernandez TD, Doña I, Aranda A, Blanca-Lopez N, Melendez L, Canto G, Blanca M, Torres MJ, Mayorga C. Basophil activation after nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulation in patients with immediate hypersensitivity reactions to these drugs. *Cytometry A*. 2014 Jan 17. doi: 10.1002/cyto.a.22443.

**Asher MI**, Weiland SK. The International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clin Exp Allergy* 1998; 5:52-66.

## **B**

**Bachert C**, Wagenmann M, Haus U. Proinflammatory cytokines: measurement in nasal secretion and induction of adhesion receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:106-108.

**Bachert C**, Ganzer U. Localization of IgE synthesis in immediate-type allergy of the upper respiratory tract. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1998;50(4):257-64.

**Bachert C**. Histamine--a major role in allergy? *Clin Exp Allergy*. 1998 Dec;28 Suppl 6:15-9.

**Bachert C**, van Kempen M, Van Cauwenberge P. Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Feb-Apr;118(2-4):375-9.

**Banchereau J**, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

**Barber D**, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*. 2008; 63(11):1550-8.

**Barnes K**, Marsh D. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998;19:325-332.

**Barnes KC**, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, et al. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:485-491.

**Baroody FM**, Ford S, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Naclerio RM. Physiologic responses and histamine release after nasal antigen challenge. Effect of atropine. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1457-65.

**Bauchau V**, Dirham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004;24:758-764.

**Bauchau V**, Dirham SR. Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis. *Allergy* 2005; 60: 350-3.



**Bauer GE**, Hull RD, Stokes GS, Raftos J. The reversibility of side effects of guanethidine therapy.. Med J Aust. 1973 May 12;1(19):930-3.

**Behrendt H**, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, et al. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. Int Arch Allergy Immunol 1997;113:69-74.

**Belda J**, Parameswaran K, Keith PK, Hargreave FE. Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. Clin Exp Allergy. 2001 Jul; 31(7):1111-5.

**Ben Said B**, Berard F, Bienvenu J, Nicolas JF, Rozieres A. Usefulness of basophil activation tests for the diagnosis of IgE-mediated allergy to quinolones. Allergy. 2010 Apr;65(4):535-6. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02213.x. Epub 2009 Oct 20.

**Bentley AM**, Jacobson MR, Cumberworth V, Barkans JR, Moqbel R, Schwartz LB et al. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. J Allergy Clin Immunol 1992; 89: 877-83.

**Bernstein IL**, Bernstein DI, Chan-Yeung M, Malo JL. Definition and classification of asthma In: "Asthma in the workplace" 3rd Edition. Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI., eds. Taylor&Francis Group Publishers 2006.

**Binder M**, Fierlbeck G, King Ti, Valent P, Bühring HJ. Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. Int Arch Allergy Immunol. 2002 Oct;129(2):160-8.

**Blom HM**, Godthelp T, Fokkens WJ, Klein Jan A, Holm AF, Vroom TM, Rijntjes E. Mast cells, eosinophils and IgE-positive cells in the nasal mucosa of patients with vasomotor rhinitis. An immunohistochemical study. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1995;252 Suppl 1:S33-9.

**Blom HM**, Godthelp T, Fokkens WJ, KleinJan A, Mulder PG, Rijntjes E. The effect of nasal steroid aqueous spray on nasal complaint scores and cellular infiltrates in the nasal mucosa of patients with nonallergic, noninfectious perennial rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 1997 Dec;100(6 Pt 1):739-47.

**Blumenthal M**, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Johnson B, Yunis EJ, Alper CA. HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR2], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. J Immunol. 1992;148:411-416.

**Bochner BS**. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. J Allergy Clin Immunol. 2000 Nov;106(5 Suppl):S292-302.

**Boulet LP**, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. Clin Exp Allergy 1997;27:52-59.

**Boumiza R**, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. Clin Mol Allergy. 2005 Jun 30;3:9.

**Bousquet J**, Hejjaoui A, Becker WM, Cour P, Chanal I, Lebel B, Dhivert H, Michel FB. Clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple

pollen species. I. Clinical and immunologic characteristics. J Allergy Clin Immunol. 1991 Mar;87(3):737-46.

**Bousquet J**, Van-Cauwenberge P, Khataev N, Aït-Khaled N, Annesimaesano I, Bachert C et al. ARIA workshop group. World Health Organization. Allergic Rhinitis and its impact on asthma Workshop Report. J Allergic Clin Immunol 2001; 108: S 147-334.

**Bousquet J**, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). Allergy. 2008 Apr; 63 .Suppl 86:8-160.

**Bousquet J**, Fokkens W, Burney P, Durham SR, Bachert C, Akdis CA et al. Important research questions in allergy and related diseases: nonallergic rhinitis: a GA2LEN paper. Allergy. 2008; 63(7): 842-53.

**Bousquet J**, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. Allergy 2012;67: 18-24.

**Braback L**, Hedberg A. Perinatal risk factors for atopic disease in conscripts. Clin Exp Allergy 1998;28:936-942.

**Brandding P**, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH, Holgate ST et al. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as source of IL-4, IL-5 and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. J Immunol 1993; 151: 3853-65.

**Braun-Fahriander C**, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers

living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. Clin Exp Allergy 1999;29:28-34.

**Brockow K**, Christiansen C, Kanny G, Clément O, Barbaud A, Bircher A, Dewachter P, Guéant JL, Rodriguez Guéant RM, Mouton-Faivre C, Ring J, Romano A, Sainte-Laudy J, Demoly P, Pichler WJ; ENDA; EAACI interest group on drug hypersensitivity. Management of hypersensitivity reactions to iodinated contrast media. Allergy. 2005 Feb;60(2):150-8.

**Broder I**, Higgins MW, Mathews KP, Keller JB. Epidemiology of asthma and allergic rhinitis in a total community, Tecumseh, Michigan. IV. Natural history. J Allergy Clin Immunol. 1974 Aug;54(2):100-10.

**Brozek JL**, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Rasi G, van Wijk RG, Zuberbier T, Guyatt G, Bousquet J, Schünemann HJ. Methodology for development of the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma guideline 2008 update. Allergy. 2008 Jan;63(1):38-46.

**Bufe A**, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker WM. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. Planta 1996;199:413-5.

**Burney PG**, Luczynoska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. Eur Respir J, 1994;7:954-960.

**Bustos GJ**, Bustos D, Bustos GJ, Romero O. Prevention of asthma with ketotifen in preasthmatic children: a three-year follow-up study. Clin Exp Allergy. 1995 Jun;25(6):568-73.

**Butland BK**, Strachan DP, Lewis S, Bynner J, Butier N, Britton J. Investigation into the increase in hay fever and eczema at age 16 observed between the 1958 and 1970 British birth cohorts. *BMJ* 1997;315:717-721.

## **C**

**Calderon-Garcidueñas L**, Osorno-Velazquez A, Bravo-Alvarez H, Delgado-Chavez R, Barrios-Marquez R. Histopathologic changes of the nasal mucosa in southwest Metropolitan Mexico City inhabitants. *Am J Pathol.* 1992 Jan;140(1):225-32.

**Cameron L**, Christodoulopoulos P, Lavigne F, Nakamura Y, Eidelman D, McEuen A et al. Evidence for local eosinophil differentiation within allergic nasal mucosa: Inhibition with soluble IL-5 receptor. *J Immunol* 2000; 164: 1538-45.

**Campo P**, Antunez C, Rondon C, Mayorga C, Garcia R, Ruiz M, Melendez L, Rodriguez-Bada J, Blanca M. Positive bronchial challenges to *D. pteronyssinus* in asthmatic subjects in absence of systemic atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(suppl 2):AB6.

**Campo P**, Rondón C, Villalba M, Mayorga C, Sanchez-Quintero MJ, Palomares O et al. Evaluation of in vivo and in vitro responses to nOle e1 in systemic and local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunology* 2013; 131, Spp, Page AB237 (839).

**Campoli-Richards DM**, Buckley MM, Fitton A. Cetirizine. A review of its pharmacological properties and clinical potential in allergic rhinitis, pollen-induced asthma, and chronic urticaria. *Drugs.* 1990 Nov;40(5):762-81.

**Canonica GW**, Ciprandi G, Buscaglia S, Pesce G, Bagnasco M. Adhesion molecules of allergic inflammation: recent insights into their functional roles. *Allergy* 1994;49:135-41.

**Cárdaba B**, Llanes E, Chacártegui M, Sastre B, López E, Mollá R, del Pozo V, Florido F, Quiralte J, Palomino P, Lahoz C. Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:31-5.

**Carney AS**, Jones NS. Idiopathic rhinitis: idiopathic or not? *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996 Jun;21(3):198-202.

**Carney AS**, Powe DG, Huskisson RS, Jones NS. Atypical nasal challenges in patients with idiopathic rhinitis: more evidence for the existence of allergy in the absence of atopy?. *Clin Exp Allergy*. 2002 Oct;32(10):1436-40.

**Celik GE**, Schroeder JT, Hamilton RG, Saini SS, Adkinson NF. Effect of in vitro aspirin stimulation on basophils in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin Exp Allergy*. 2009 Oct;39(10):1522-31. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03277.x. Epub 2009 May 22.

**Charpin D**, Sibbald B, Weeke E, Wuthrich B. Epidemiologic identification of allergic rhinitis. *Allergy* 1996;51:293-298.

**Chirumbolo S**. Basophil activation test (BAT) in the diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*. 2013 Dec;68(12):1627-8. doi: 10.1111/all.12323.

**Christodoulopoulos P**, Cameron L, Durham S, and Hamid Q. Molecular pathology of allergic disease II: Upper airway disease. J Allergy Clin Immunol 2000;105:211-223.

**Church MK**, Shute JK, Sampson AP. Mast-cell derived mediators. En: Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bochner BS, Gholgate ST, Simons FER, eds. Middleton's Allergy principles and practice. 6º ed. Philadelphia: Mosby Inc 2003, p. 189-212.

**Ciprandi G**, Buscaglia S, Pesce G, Pronzato C, Ricca V, Parmiani S, et al. Minimal persistent inflammation is present at mucosal level in patients with asymptomatic rhinitis and mite allergy. J Allergy Clin Immunol 1995;96:971-9.

**Ciprandi G**, Cirillo I, Vizzaccaro A, Tosca M, Passalacqua G, Pallesstrani E, Canonica GW. Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? Allergy 2005; 60: 882-7.

**Clement PA**. Committee report on standardization of rhinomanometry. Rhinology. 1984 Sep;22(3):151-5.

**Clement PA**. Rhinomanometry. Allergy. 1997;52(33 Suppl):26-7.

**Comoy EE**, Pestel J, Duez C, Stewart GA, Vendeville C, Fournier C, Finkelman F, Capron A, Thyphronitis G. The house dust mite allergen, Dermatophagoides pteronyssinus, promotes type 2 responses by modulating the balance between IL-4 and IFN-gamma. J Immunol 1998;160(5):2456-62.

**Connell JT**. Quantitative intranasal pollen challenges. 3. The priming effect in allergic rhinitis. J Allergy 1969;43:33-44.

**Corominas, M;** Buendia, E. (1991). Hipersensibilidad inmediata. Inmunologia.Luzan, Dome-Hollister. 16: 333-344.

**Cozon G,** Ferrándiz J, Peyramond D, Brunet J. Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. Allergol Immunopathol (Madr) 1999 Jul-Aug;27(4):182-7.

## **D**

**De Weck, AL** Immunopathological mechanisms and clinical aspects of allergic reactions to drugs. Allergic reactions to drugs. B. H. Berlin, 1983.Springer-Verlag: 75 133.

**De Weck AL,** Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Blanca M, Correia S, Erdman S, Jermann JM, Kanny G, Kowalski M, Mayorga L, Medrala W, Merk A, Sturm GJ, Sainte-Laudy J, Schneider MS, Szczeklik A, Weber JM, Wedi A. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome. A multicenter study. I. Clinical findings and in vitro diagnosis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19(5):355-69.

**Demoly P,** Allaert FA, Lecasble M, Bousquet J. Validation of classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). Allergy 2003; 58: 672-5.

**Desrosiers M,** Nguyen B, Ghezze H, Leblanc C, Malo JLNasal response in subjects undergoing challenges by inhaling occupational agents causing asthma through the nose and mouth. Allergy. 1998 Sep;53(9):840-8.

**Deuschl H,** Johansson SG. Immunoglobulins in tracheo-bronchial secretion with special reference to IgE. Clin Exp Immunol 1974;16(3):401-12.



**Doña I**, Blanca-López N, Torres MJ, García-Campos J, García-Núñez I, Gómez F, Salas M, Rondón C, Canto MG, Blanca M. Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):363-71.

**Dordal MT**, Lluch-Bernal M, Sánchez MC, Rondón C, Navarro A, Montoro J, Matheu V, Ibáñez MD, Fernández-Parra B, Dávila I, Conde J, Antón E, Colás C, Valero A; SEAIC Rhinoconjunctivitis Committee. Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(1):1-12; quiz follow 12.

**Dullaers M**, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Geavert P, Lambrecht BN. The who, where and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 635-45.

**Durham SR**, Gould HJ, Thienes CP, Jacobson MR, Masuyama K, Rak S, Lowhagen O, Schotman E, Cameron L, Hamid QA. Expression of epsilon germ-line gene transcripts and mRNA for the epsilon heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid. *Eur J Immunol*. 1997 Nov;27(11):2899-906.

**Durham SR**, James LK. Rhinitis with negative skin tests and absent serum allergen-specific IgE: more evidence for local IgE? *J Allergy Immunol*. 2009 Nov;124 (5):1012-3.doi:10.1016/j.jaci.2009.09.029.

**Dykewicz MS**, Fineman S. Executive summary of Joint Task Force Practice Parametres on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81: 463-8.

## **E**

**Ebo DG**, Lechkar B, Schuerwegh AJ, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy*. 2002 Aug;57(8):706-12.

**Ebo DG**, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy*. 2004 Mar;34(3):332-9.

**Erjefalt JS**, Greiff L, Anderson M, Matsson E, Petersen H, Linden M et al. Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 304-12.

## **E**

**Fabra Llopis JM**, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 1990.

**Fatti LM**, Scacchi M, Pincelli AI, Lavezzi E, Cavagnini F. Prevalence and pathogenesis of sleep apnea and lung disease in acromegaly. *Pituitary*. 2001 Sep;4(4):259-62.

**Fernández-Caldas E**, Puerta L, Caraballo L, Lockey RF. Mite allergens. *Clin Allergy Immunol* 2004;18: 251-70.

**Fokkens WJ**, Vroom TM, Rijntjes E, Mulder PG. Fluctuation of the number of CD-1(T6)-positive dendritic cells, presumably Langerhans cells, in the nasal mucosa of patients with an isolated grass-pollen allergy before, during, and after the grass-pollen season. *J Allergy Clin Immunol*. 1989 Jul;84(1):39-43.

**Fokkens WJ**, Broekhuis-Fluitsma DM, Rijntjes E, Vroom TM, Hoefsmit EC. Langerhans cells in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy. *Immunobiology* 1991;182:135-42.

**Fokkens WJ**. Thoughts on the pathophysiology of nonallergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002 May;2(3):203-9.

**Frosh AC**, Sandhu G, Joyce R, Strachan DP. Prevalence of rhinitis, pillow type and past and present ownership of furred pets. *Clin Exp Allergy* 1999;29:457-60.

**Fuiano N**, Fusilli S, Incorvaia C. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012 Mar-Apr;40(2):71-4.

## **G**

**Gamboa PM**, García-Avilés MC, Urrutia I, Antépara I, Esparza R, Sanz ML. Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004;14(4):278-83.

**Gane P**, Pecquet C, Lambin P, Abuaf N, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric evaluation of human basophils. *Cytometry* 1993;14(3):344-8.

**García M**, Fernández E, Del Pozo MD, Navarro JA, Gastaminza G, Olasagasti C. Prevalence of asthma and atopy in gipsy and non-gipsy population in a district of Vitoria-Gasteiz. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology-ECACI 95. Madrid. 25-30 Junio 1995.

**Gautrin D**, Desrosiers M, Castano R. Occupational rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;6(2):77-84.

**Gell, P**, Coombs, R. (1963). *Clinical aspects of immunology*, Blackwell Scientific.

**Gendo K**, Larson EB. Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. *Ann Intern Med*. 2004 Feb 17;140(4):278-89.

**Gergen PJ**, Turkeltaub PC, Kramer RA. Age of onset in childhood asthma: data from a national cohort. *Ann Allergy*. 1992 Jun;68(6):507-14

**Gerth van Wijk R**, Dieges PH. Nasal hyper-responsiveness to histamine, methacholine and phentolamine in patients with perennial non-allergic rhinitis and in patients with infectious rhinitis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1991 Apr;16(2):133-7.

**Gillam SJ**, Jarman B, White P, Law R. Ethnic differences in consultation rates in urban general practice. *BMJ* 1989;299:953-957.

**Girgis IH**, Yassin A, Hamdy H, Moris M. Estimation of effect of drugs on the nasal circulation. *J Laryngol Otol*. 1974 Dec;88(12):1163-8.

**Godthelp T**, Fokkens WJ, Kleinjan A, Holm AF, Mulder PG, Prens EP, Rijntes E. Antigen presenting cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis during allergen provocation. *Clin Exp Allergy*. 1996 Jun;26(6):677-88.

**Gómez E**, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G, Blanca M, Mayorga C. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone:

value of basophil activation test in the identification of patients. Clin Exp Allergy. 2009 Aug;39(8):1217-24. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03237.x. Epub 2009 Apr 7.

**Gómez E**, Campo P, Rondón C, Barrionuevo E, Blanca-López N, Torres MJ, et al. Role of basophil activation test in the diagnosis of local allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2013. 132(4):975-6.e1-5.

**González EM**, Villalba M, Lombardero M, Aalbers M, van Ree R, Rodríguez R. Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. Mol Immunol. 2002;39(1):93-101.

**González EM**, Villalba M, Quiralte J, Batanero E, Roncal F, Albar JP, Rodríguez R. Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. Mol Immunol. 2006 ;43(6):570-8.

**Gould HJ**, Takhar P, Harries HE, Durham SR, Corrigan CJ. Germinal-centre reactions in allergic inflammation. Trends Immunol 2006; 27(10):446-52.

**Gregory C**, Cifaldi M, Tanner LA. Targeted intervention programs: creating a customized practice model to improve the treatment of allergic rhinitis in a managed care population. Am J Manag Care. 1999 Apr;5(4):485-96.

**Grymer LF**, Hilberg O, Pedersen OF, Rasmussen TR. Acoustic rhinometry: values from adults with subjective normal nasal patency. Rhinology 1991.Mar;29(1):35-47.

**Gwaltney JJr**, Scheld WM, Sande MA, Syndor A. The etiology and antimicrobial therapy of adults with acute community-acquired sinusitis: a fifteen-year experience at the University of Virginia and review of other selected studies. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:457-461.

**Gwaltney JJr**. Acute community-acquired sinusitis. *Clin Infect Dis* 1996;23:1209-1223; quiz 24-25.

## **H**

**Hauswirth AW**, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Schernthaner GH, Sperr WR, Bühring HJ, Valenta R, Valent P. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Immunol*. 2002. Jul;110(1):102-9.

**Hesselmar B**, Aberg N, Aberg B, Eriksson B, Bjorksten B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy* 1999;29:611-7.

**Hilberg O**, Jackson AC, Swift DL, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: evaluation of nasal cavity geometry by acoustic reflection. *J Appl Physiol* (1985). 1989 Jan;66(1):295-303.

**Hilberg O**, Pedersen OF. Acoustic rhinometry: recommendations for technical specifications and standard operating procedures [published erratum in *Rhinology* 2001;39:119] *Rhinol Suppl* 2000;16:3–17. *Clin Immunol* 1999;104: 301–304. *J Biol Chem*. 1993;268: 25846-56.

**Holgate ST**, Djukanović R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. 2005 Apr;35(4):408-16.

**Holm AF**, Fokkens WJ, Godthelp T, Mulder PG, Vroom TM, Rijntjes E. Effect of 3 months' nasal steroid therapy on nasal T cells and Langerhans cells in patients suffering from allergic rhinitis. *Allergy*. 1995 Mar;50(3):204-9.

**Holmberg K**, Bake B, Pipkorn U. Nasal mucosal blood flow after intranasal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:541-7.

**Holopainen E**, Tarkiainen E, Malmberg H Nasal challenge. *Rhinology*. 1976 Dec;14(4):181-8.

**Holt PG**, Macaubas C. Development of long-term tolerance versus sensitisation to environmental allergens during the perinatal period. *Curr Opin Immunol* 1997;9:782-787.

**Howarth PH**. Allergic and non allergic rhinitis. En: Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FER, eds. *Middleton's Allergy principles and practice*. 6º ed. Philadelphia: Mosby Inc 2003, 1391-410.

**Howarth PH**, Persson CG, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Mar;115(3 Suppl 1):S414-41.

**Huang SK**, Yi M, Palmer E, Marsh DG. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol* 1995;154:6157-6162.

**Huby RD**, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci* 2000;55(2):235-46.

**Huecas S**, Villalba M, González E, Martínez-Ruiz A, Rodríguez R. Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem*. 1999; 261(2):539-46.

**Huggins HK, Brostoff J**. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet*. 1975 Jul 26;2(7926):148-50.

**Humbert M**, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB. High-affinity IgE receptor (FcεRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1931-7.

**Humbert M**, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*. 1999 Nov;20(11):528-33.

!

**Iliopoulos O**, Proud D, Adkinson N, Jr., Norman PS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, et al. Relationship between the early, late, and rechallenge reaction to nasal challenge with antigen: observations on the role of inflammatory mediators and cells. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:851-61.

**Iliopoulos O**, Baroody FM, Naclerio RM, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge



have functional and phenotypic characteristics of basophils. J Immunol 1992;148:2223-8.

**Incaudo G**, Schatz M. Rhinosinusitis associated with endocrine conditions: hypothyroidism and pregnancy. In: Schatz M, Settipane GA, eds. Nasal manifestations of systemic diseases. Providence, RI, USA: Oceanside, 1991; 54. 19.

#### **International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis.**

International Rhinitis Management Working Group. Allergy 1994; 49: S1-34.

**Ishizaka K**, Newcomb RW. Presence of gammaE in nasal washings and sputum from asthmatic patients. J Allergy 1970;46(4):197-204.27.

**Ishizaka T**, Ishizaka K, Conrad DH, Froese A. A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. J Allergy Clin Immunol. 1978 May;61(5):320-30.

**Ito N**, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):44898-904. Epub 2002 Sep 19.

**J**

**Jacobs RL**, Freedman PM, Boswell RN. Nonallergic rhinitis with eosinophilia (NARES syndrome). Clinical and immunologic presentation. J Allergy Clin Immunol. 1981 Apr;67(4):253-62.

**Jarvis D**, Luczynska C, Chinn S, Burney P. The association of age, gender and smoking with total IgE and specific IgE. Clin Exp Allergy 1995;25:1083-1091.

**Jarvis D**, Chinn S, Luczynska C, Burney P. The association of smoking with sensitization to common environmental allergens: results from the European Community Respiratory Health Survey. J Allergy Clin Immunol 1999;104:934-940.

**Jayaratham A**, Corrigan CJ, Lee TH. The continuing enigma of non-atopic asthma. Clin Exp Allergy. 2005 Jul;35(7):835-7.

**Jenssen M**, Malm L. Definiton, prevalence and development of nasal obstruction. Allergy 1997; 52: S3-6.

**Juliusson S**, Bende M. Priming effect of a birch pollen season studied with laser Doppler flowmetry in patients with allergic rhinitis. Clin Allergy 1988;18:615-8.

## **K**

**Kahlert H**, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. Clin Exp Allergy. 2003 Sep;33(9):1266-72.

**Kaufman HS**. Timolol-induced vasomotor rhinitis: a new iatrogenic syndrome. Arch Ophthalmol 1986; 104:967-70.

**Kennedy J**, Chen P, Payne S, Steinke J, Borish L. Local class switching In Nasal Mucosa In Non-allergic Rhinitis. J Allergy Clin Immunol 127(2) Supplem, AB52, 2011.

**Khanna P**, Shah A. Categorization of patients with allergic rhinitis: comparative profile of “sneezers and runners” and “blockers”. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94: 60-4.

**Kinhult J**, Egesten A, Benson M, Uddman R, Cardell LO. Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clin Exp Allergy*. 2003 Aug;33(8):1141-6.

**Kleine-Tebbe J**, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW Jr, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(1):79-90. Epub 2006 Jul 11.

**KleinJan A**, McEuen AR, Dijkstra MD, Buckley MG, Walls AF, Fokkens WJ. Basophil and eosinophil accumulation and mast cell degranulation in nasal mucosa of patients with hay fever after local allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 677-86.

**Klementsson H**. Eosinophils and the pathophysiology of allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1992;22:1058-64.

**Knani J**, Campbell A, Enander I, Peterson CG, Michel FB, Bousquet J. Indirect evidence of nasal inflammation assessed by titration of inflammatory mediators and enumeration of cells in nasal secretions of patients with chronic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:880-889.

**Knol EF**, Koenderman L, Mul E, Verhoeven AJ, Roos D. Differential mechanisms in the stimulus-secretion coupling in human basophils: evidence for a protein-kinase-C-dependent and a protein-kinase-C-independent route. *Agents Actions*. 1990 Apr;30(1-2):49-52.

**Kramer U**, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999;353:450-454.

**Kroegel C**, Jäger L, Walker C. Is there a place for intrinsic asthma as a distinct immunopathological entity? *Eur Respir J*. 1997 Mar;10(3):513-5.

## **L**

**Lagier B**, Pons N, Rivier A, Chanal I, Chanez P, Bousquet J, Pène J. Seasonal variations of interleukin-4 and interferon-gamma release by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects stimulated by polyclonal activators. *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Dec;96(6 Pt 1):932-40.

**Landis J**, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.

**Laroche D**, Aimone-Gastin I, Dubois F, Huet H, Gérard P, Vergnaud MC, Mouton-Faivre C, Guéant JL, Laxenaire MC, Bricard H. Mechanisms of severe, immediate reactions to iodinated contrast material. *Radiology*. 1998 Oct;209(1):183-90.

**Lau S**, Falkenhorst G, Weber A, Werthmann I, Lind P, Buettner-Goetz P, et al. High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:718-25.

**Lebel B**, Bousquet J, Morel A, Chanal I, Godard P, Michel FB. Correlation between symptoms and the threshold for release of mediators in nasal secretions during nasal challenge with grass-pollen grains. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:869-77.

**Ledesma A**, González E, Pascual CY, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. Are Ca<sup>2+</sup>-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. Clin Exp Allergy. 2002;32(10):1476-83.

**Leone C**, Teodoro C, Pelucchi A, Mastropasqua B, Caviglioli G, Marazzini L, Foresi A. Bronchial responsiveness and airway inflammation in patients with nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome. J Allergy Clin Immunol. 1997 Dec;100(6 Pt 1):775-80.

**Leroyer C**, Malo JL, Girard D, Dufour JG, Gautrin D. Chronic rhinitis in workers at risk of reactive airways dysfunction syndrome due to exposure to chlorine. Occup Environ Med 1999; 56: 334-8.

**Leynaert B**, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. J Allergy Clin Immunol. 1999 Aug;104(2 Pt 1):301-4.

**Liccardi G**, Russo M, Piccolo A, Lobefalo G, Salzillo A, D'Amato M, D'Amato G. The perennial pattern of clinical symptoms in children monosensitized to *Olea europaea* pollen allergens in comparison with subjects with *Parietaria* and *Gramineae* pollinosis. Allergy Asthma Proc. 1997 Mar-Apr;18(2):99-105.

**Llanes E**, Quiralte J, López E, Sastre B, Chacártegui M, del Pozo V, Palomino P, Lahoz C, Cárdena B. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. Int Arch Allergy Immunol. 2009;148(3):228-38.

**Lombardero M**, Quirce S, Duffort O, Barber D, Carpizo J, Chamorro MJ, Lezaun A, Carreira J. Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic

activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen. J Allergy Clin Immunol. 1992 Apr;89(4):884-94.

**López S**, Rondón C, Torres MJ, Campo P, Canto G, Fernandez R, Garcia R, Martínez-Cañavate A, Blanca M. Immediate and dual response to nasal challenge with Dermatophagoides pteronyssinus in local allergic rhinitis. Clin Exp Allergy. 2010 Jul;40(7):1007-14.

**Lund VJ**, Scadding GK. Immunologic aspects of chronic sinusitis. J Otolaryngol 1991;20:379-81.

## **M**

**Magnussen H**, Jorres R, Nowak D. Effect of air pollution on the prevalence of asthma and allergy: lessons from the German reunification. Thorax 1993; 48: 879-81.

**Mahoney NM**, Janmey PA, Almo SC. Structure of the profilin-poly-Lproline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. Nat Struct Biol 1997;4:953-60.

**Malm L**. Definition, prevalence and development of nasal obstruction. Allergy. 1997;52(40 Suppl):3-6.

**Malm L**, Gerth van Wijk R, Bachert C Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow, and airflow resistance. International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society. Rhinology. 2000 Mar;38(1):1-6.

**Manfredi M**, Severino M, Testi S, Macchia D, Ermini G, Pichler WJ, Campi P. Detection of specific IgE to quinolones. J Allergy Clin Immunol. 2004 Jan;113(1):155-60.

**Manning SC**, Holman M. Further evidence for allergic pathophysiology in allergic fungal sinusitis. Laryngoscope. 1998 Oct;108(10):1485-96.

**Marcucci F, Sensi L**. A new method for IgE detection in nasal mucosa. Clin Exp Allergy. 1989 Mar;19(2):157-62.

**Marcucci F**, Sensi LG, Migali E, Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen-allergic rhinitis and asthma. Allergy. 2001 Mar;56(3):231-6.

**Marogna M**, Spadolini I, Massolo A, Canonica GW, Passalacqua G. Randomized controlled open study of sublingual immunotherapy for respiratory allergy in real-life: clinical efficacy and more. Allergy. 2004 Nov;59(11):1205-10.

**Marsh DG**, Meyers DA, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Roebber M, Norman PS, et al. HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. II. Response after ragweed immunotherapy. J Exp Med 1982;155:1452-1463.

**Martín-Orozco E**, Cárdaba B, del Pozo V, de Andrés B, Villalba M, Gallardo S et al. Ole e1: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. Int Arch Allergy Immunol. 1994;104(2):160-70.

**Matsuwaki Y**, Uno K, Okushi T, Otori N, Moriyama H. Total and antigen- (fungi, mites and staphylococcal enterotoxins) specific IgEs in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161 Suppl 2:147-53. doi: 10.1159/000350387. Epub 2013 May 29.

**Mayorga C**, Andreu I, Aranda A, Doña I, Montañez MI, Blanca-Lopez N, Ariza A, Nuin E, Blanca M, Miranda MA, Torres MJ. Fluoroquinolone photodegradation influences specific basophil activation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(4):377-82. doi: 10.1159/000343023. Epub 2012 Nov 22.

**Mérida Fernández C**, Ramírez Hernández M y Guerra Pasadas F. Anatomía y fisiología de las fosas nasales. José María Negro Álvarez ed. Rinitis Alérgica: Mecanismos y Tratamiento, segunda ed. Mataro: mra ediciones 2004:127-134.

**Molfino NA**, Slutsky AS, Zamel N. The effects of air pollution on allergic bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1992;22:667-672.

**Molgaard E**, Thomsen SF, Lund T, Pedersen L, Nolte H, Backer V. Differences between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adolescents and adults. *Allergy*. 2007 Sep;62(9):1033-7. Epub 2007 Jun 18.

**Moneret-Vautrin DA**, Hsieh V, Wayoff M, Guyot JL, Mouton C, Maria Y. Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome a precursor of the triad: nasal polyposis, intrinsic asthma, and intolerance to aspirin. *Ann Allergy* 1990;64:513-518.

**Moneret-Vautrin DA**, Jankowski R, Bene MC, Kanny G, Hsieh V, Faure G, et al. NARES: a model of inflammation caused by activated eosinophils? *Rhinology* 1992;30:161-168.



**Moneret-Vautrin DA**, Sainte-Laudy J, Kanny G, Frémont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999 Jan;82(1):33-40.

**Monneret G**, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol*. 1999 Mar;115(3):393-6.

**Monneret G**, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol*. 2002 Feb;102(2):192-9.

**Montefort S**, Feather IH, Wilson SJ, Haskard DO, Lee TH, Holgate ST, et al. The expression of leukocyte-endothelial adhesion molecules is increased in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:393-8.

**Mora González A**. Definición y clasificación de la rinitis. José María Negro Álvarez ed. *Rinitis Alérgica: Mecanismos y Tratamiento*, segunda ed. Mataro: mra ediciones 2004: 135-141.

**Morales C**, Peláez A, Alba P, Iglesias I, Ojeda L. Rinitis alérgica: Estudio comparativo de la clasificación tradicional y la propuesta por ARIA. *Alergol Inmunol Clin* 2005; 20: S126-7.

**Mouthuy J**, Detry B, Sohy C, Pirson F, Pilette C. Presence in sputum of functional dust mite-specific IgE antibodies in intrinsic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(2):206-14.

**Mullarkey MF**, Hill JS, Webb DR. Allergic and nonallergic rhinitis: their characterization with attention to the meaning of nasal eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1980;65:122-126.

**Mullo J**, Rieves RD, Baraniuk JN, Lundgren JD, Merida M, Hausfeld JH, et al. The effects of neuropeptides on mucous glycoprotein secretion from human nasal mucosa in vitro. *Neuropeptides* 1992;21:231-8.

**Muñoz López F**. Ríos Alcolea M. Estudio epidemiológico de la patología alérgica en la población general infantil en España. Repercusión socioeconómica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1994; 9: 23-5.

**Mygind N**, Dirksen A, Johnsen NJ, Weeke B. Perennial rhinitis: an analysis of skin testing, serum IgE, and blood and smear eosinophilia in 201 patients. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1978 May;3(2):189-96.

**Mygind N**, Weeke B. Allergic and non allergic rhinitis. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Eds. *Allergy principles and practice*. 2ºed. ST Louis: The C.V. Mosby Company 1983. p. 1101-17.

## **N**

**Naclerio RM**, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson N, Jr., Meyers DA, Norman PS, et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:597-602.

**Naclerio RM**. The role of histamine in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Oct;86(4 Pt 2):628-32.

**Naclerio RM.** Allergic rhinitis. N Engl J Med 1991; 325: 860-9.

**Nathan RA,** Eccles R, Howarth PH, Steinsvåg SK, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2005 Mar;115(3 Suppl 1):S442-59.

**Navarro A,** Colás C, Antón E, Conde J, Dávila I, Dordal MT, Fernández-Parre B, Ibáñez MD, Lluch-Bernal M, Matheu V, Montoro J, Rondón C, Sánchez MC, Valero A; Rhinoconjunctivitis Committee of the SEAIC. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica-2005. J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19 Suppl 2:7-13. Erratum in: J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19(4):339.

**Ng ML,** Warlow RS, Chrishanthan N, Ellis C, Walls R. Preliminary criteria for the definition of allergic rhinitis: a systematic evaluation of clinical parameters in a disease cohort (I). Clin Exp Allergy. 2000 Sep;30(9):1314-31.

**Novembre E,** Galli E, Landi F, Caffarelli C, Pifferi M, De Marco E, Burastero SE, Calori G, Benetti L, Bonazza P, Puccinelli P, Parmiani S, Bernardini R, Vierucci A. Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol. 2004 Oct;114(4):851-7.

## **Q**

**Olivé Pérez A.** Rinitis yatrogénicas. Patología nasal de interés en alergología. Ed. Masson, Barcelona, 1995.

## **P**

**Palomares O,** Swoboda I, Villalba M, Balic N, Spitzauer S, Rodríguez R et al. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae. Int Arch Allergy Immunol. 2006;141(2):110-8.

**Pâris-Köhler A**, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):339-45.

**Passalacqua G**, Ciprandi G, Canonica GW. United airways disease: therapeutic aspects. *Thorax*. 2000 Oct;55 Suppl 2:S26-7.

**Pawankar RU**, Okuda M, Okubo K, Ra C. Lymphocyte subsets of the nasal mucosa in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2049-2058.

**Pawankar R**, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 1997;99:1492-1499.

**Pawankar R**, Yamagishi S, Yagi T. Revisiting the roles of mast cells in allergic rhinitis and its relation to local IgE synthesis. *Am J Rhinol* 2000;14(5):309-17.

**Pawankar R**. Mast cells in allergic airway disease and chronic rhinosinusitis. *Chem Immunol Allergy* 2005;87:111–129.

**Pawankar R**. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clin Exp Allergy*. 2008 May;38(5):812-21.

**Pedersen PA**, Weeke ER. Allergic rhinitis in Danish general practice. Prevalence and consultation rates. *Allergy*. 1981 Aug;36(6):375-9.

**Pène J**, Rivier A, Lagier B, Becker WM, Michel FB, Bousquet J. Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy. *Immunology*. 1994 Jan;81(1):58-64.

**Pinnobphun P**, Buranapraditkun S, Kampitak T, Hirankarn N, Klaewsongkram J. The diagnostic value of basophil activation test in patients with an immediate hypersensitivity reaction to radiocontrast media. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 May;106(5):387-93. doi: 10.1016/j.anai.2010.12.020. Epub 2011 Feb 5.

**Pirilä T**, Nuutinen J. Acoustic rhinometry, rhinomanometry and the amount of nasal secretion in the clinical monitoring of the nasal provocation test. *Clin Exp Allergy*. 1998 Apr;28(4):468-77.

**Platts-Mills TA**. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol* 1979;122(6):2218-25.

**Platts-Mills JA**, Custis NJ, Woodfolk JA, Platts-Mills TA. Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implications for cat-specific tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Aug;116(2):384-9.

**Ponsonby AL**, Couper D, Dwyer T, Carmichael A, Kemp A. Relationship between early life respiratory illness, family size over time, and the development of asthma and hay fever: a seven year follow up study. *Thorax* 1999;54:664-9.

**Poole JA**, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 May;5(3):252-8.

**Powe DG**, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. Clin Exp Allergy. 2001 Jun;31(6):864-72.

**Powe DG**, Jagger C, Kleinjan A, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. 'Entropy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. Clin Exp Allergy. 2003 Oct;33(10):1374-9.

**Powe DG**, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, McEuen AR, Walls AF, Jones NS. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. Allergy. 2004 Feb;59(2):204-12.

**Powe DG**, Bonnin AJ, Jones NS. 'Entropy': local allergy paradigm. Clin Exp Allergy. 2010; 40(7):987-97.

**Powe DG**, Groot Kormelink T, Sisson M, Blokhuis BJ, Kramer MF, Jones NS, Redegeld FA. Evidence for the involvement of free light chain immunoglobulins in allergic and nonallergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(1):139-45.e1-3.

**Proud D**, Naclerio RM, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Valentine MD. Effects of a single-dose pretreatment with captopril on the immediate response to nasal challenge with allergen. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1990;93(2-3):165-70.

## **Q**

**Quiralte J**, González E, Arias de Saavedra JM, et al. Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europaea pollinosis. Int Arch Allergy Immunol. 2000;122: 101–107.

**Quiralte J**, Florido F, Arias de Saavedra JM, Gómez A, Sáenz de San Pedro B, González E, Rodríguez R. Olive allergen-specific IgE responses in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Allergy*. 2002;57 Suppl 71:47-52.

**Quiralte J**, Palacios L, Rodríguez R, Cárdbaba B, Arias de Saavedra JM, Villalba M, Florido JF, Lahoz C. Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:24-30.

## **R**

**Rackemann FM**, A working classification of asthma. *Am J Med*. 1947 Nov;3(5):601-6.

**Rak S**, Jacobson MR, Sudderick RM, Masuyama K, Juliusson S, Kay AB, Hamid Q, Löwhagen O, Durham SR. Influence of prolonged treatment with topical corticosteroid (fluticasone propionate) on early and late phase nasal responses and cellular infiltration in the nasal mucosa after allergen challenge. *Clin Exp Allergy*. 1994 Oct;24(10):930-9.

**Raphael G**, Raphael MH, Kaliner M. Gustatory rhinitis: a syndrome of food-induced rhinorrhea. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:110-5.

**Ricca V**, Landi M, Ferrero P, Bairo A, Tazzer C, Canonica GW, et al. Minimal persistent inflammation is also present in patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:54-57.

**Robert GH**, Adkinson NF. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2suppl): S687-701.

**Rodríguez R**, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125(3):185-95.

**Rodríguez R**, Villalba M, Batanero E, González EM, Monsalve RI, Huecas S, et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*. 2002;57 Suppl 71:6-16.

**Rodríguez-Trabado A**, Cámara-Hijón C, Ramos-Cantariño A, Porcel-Carreño SL, Jiménez-Timón S, Pereira-Navarro G, Hernández-Arbeiza FJ, Fernández-Pereira L. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc*. 2008 May-Jun;29(3):241-9. doi: 10.2500/aap.2008.29.3114.

**Romanet-Manent S**, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D; EGEA Cooperative Group. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy*. 2002 Jul;57(7):607-13.

**Rondón C**, Romero JJ, López S, Antúnez C, Martín-Casañez E, Torres MJ, Mayorga C, R-Pena R, Blanca M. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):899-905.

**Rondón C**, Doña I, López S, Campo P, Romero JJ, Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Seasonal idiopathic rhinitis with local inflammatory response and specific IgE in absence of systemic response. *Allergy*. 2008 Oct;63(10):1352-8.

**Rondón C**, Doña I, Torres MJ, Campo P, Blanca M. Evolution of patients with nonallergic rhinitis supports conversion to allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1098-102.

**Rondón C**, Fernández J, López S, Campo P, Doña I, Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Nasal inflammatory mediators and specific IgE production after nasal challenge with



grass pollen in local allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2009 Nov; 124(5):1005-11.e1.doi:10.1016/j.jaci.2009.07.018-Epub 2009 Oct 1.

**Rondón C**, Fernandez J, Canto G, Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, clinical manifestations, and diagnostic approach. J Investig Allergol Clin Immunol. 2010; 20(5):364-71.

**Rondón C**, Canto G, Blanca M. Local allergic rhinitis: a new entity, characterization and further studies. Curr opin Allergy Clin Immunol. 2010. Feb;10 (1):1-7.

**Rondón C**, Canto G, Fernández J, Blanca M. Are free light chain immunoglobulins related to nasal local allergic rhinitis? J Allergy Clin Immunol. 2010 Sep; 126 (3): 677; author reply 677-8.

**Rondón C**, Campo P, Herrera R, Blanca-Lopez N, Melendez L, Canto G, Torres MJ, Blanca M. Nasal allergen provocation test with multiple aeroallergens detects polysensitization in local allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2011 Dec;128(6):1192-7.

**Rondón C**, Blanca-López N, Aranda A, Herrera R, Rodríguez-Bada JL, Canto G, Mayorga C, Torres MJ, Campo P, Blanca M. Local allergic rhinitis: allergen tolerance and immunologic changes after preseasonal immunotherapy with grass pollen. J Allergy Clin Immunol. 2011 Apr;127(4):1069-71.

**Rondón C**, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, Mullol J, Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jun;129(6):1460-7.

**Rondón C**, Campo P, Galindo L, Blanca-López N, Cassinello MS, Rodriguez-Bada JL, Torres MJ, Blanca M. Prevalence and clinical relevance of local allergic rhinitis. *Allergy*. 2012 Oct;67(10):1282-8.

**Rondón C**, Campo P, Zambonino MA, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Melendez L et al. Follow-up study in local allergic rhinitis shows a consistent entity not evolving to systemic allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133 (4):1026-31.

**Roquat A**, Ihre E, van Hage-Hamsten M, Hallden G, Zetterstrom O. Allergen-induced inflammation in the nose: a comparison of acute and repeated low-dose allergen exposure. *Allergy* 1996;51:42-8.

**Ross RN**, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther*. 2000 Mar;22(3):342-50.

## **S**

**Sabbah A**, Sainte-Laudy J. Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACI International* 1996;8: 116-9.

**Sainte-Laudy J**, Vallon C, Guérin JC. [Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis]. *Allerg Immunol (Paris)*. 1994 Jun;26(6):211-4.

**Sainte-Laudy J**, Sabbah A, Vallon C, Guerin JC. Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res*. 1998 Oct;47(10):401-8.

**Sainte-Laudy J**, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy*. 2000 Aug;30(8):1166-71.

**Salas M**, Gomez F, Fernandez TD, Doña I, Aranda A, Ariza A, Blanca-López N, Mayorga C, Blanca M, Torres MJ. Diagnosis of immediate hypersensitivity reactions to radiocontrast media. *Allergy*. 2013 Sep;68(9):1203-6. doi: 10.1111/all.12214. Epub 2013 Aug 31.

**Salib RJ**, Kumar S, Wilson SJ, Howarth PH. Nasal mucosal immunoexpression of the mast cell chemoattractants TGF-beta, eotaxin, and stem cell factor and their receptors in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 799-806.

**Salib RJ**, Lau L, Howarth PH. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 811-9.

**Salib RJ**, Harries PG, Nair SB, Howarth PH. Mechanisms and mediators of nasal symptoms in non-allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2008 Mar;38(3):393-404.

**Samter M. Intolerance to Aspirin**: Clinical Studies and Consideration of its Pathogenesis. *Ann Intern Med*. 1968;68(5):975-983. doi:10.7326/0003-4819-68-5-975.

**Sánchez-Guerrero Villanos I**. Patogenia de la rinitis alérgica. José María Negro Álvarez ed. *Rinitis Alérgica: Mecanismos y Tratamiento*, segunda ed. Mataro: mra ediciones 2004:153-163.

**Sánchez-López J**, Tordesillas L, Pascal M, Muñoz-Cano R, Garrido M, Rueda M, et al. Role of Art v 3 in pollinosis of patients allergic to Pru p 3. J Allergy Clin Immunol. 2014;133 (4):1018-1025.

**Sandford AJ**, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, et al. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. Lancet 1993;341:332-334.

**Santos MC**, Carlos ML, Pedro E, Carlos AG. Laboratory diagnosis of hymenoptera venom allergy: comparative study between specific IgE, western blot and allergen leukocyte stimulation (CAST). Allergy Immunol (Paris) 2002 Jan;34(1):6-9.

**Sanz ML**, Sánchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, Diéguez I, De Weck AL. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus and Lolium perenne. Clin Exp. Allergy. Jul;31(7):1007-13.

**Sanz ML**, Gamboa PM, Antépara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Avilés C, Chazot M, De Weck AL. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. Clin Exp. Allergy. 2002 Feb;32(2):277-86.

**Sanz ML**, Gamboa PM, García-Avilés C, Vila L, Diéguez I, Antépara I, de Weck AL. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. Int Arch Allergy Immunol 2003 Jan;130(1):33-9.

**Sanz ML**, Gamboa P, de Weck AL. A new combined test with flowcytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 Jan;136(1):58-72. Epub 2004 Dec 8.

**Saporta M**, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001 May;56(5):442-5.

**Scadding GK**, Darby YC, Austin CE. Acoustic rhinometry compared with anterior rhinomanometry in the assessment of the response to nasal allergen challenge. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994 Oct;19(5):451-4.

**Scadding GK**. Rhinitis medicamentosa. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:391-4.

**Scadding GK**. Comparison of medical and surgical treatment of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002 Nov;2(6):494-9.

**Scadding GK**, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG et al. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clin Transl Allergy* 2011;10;1(1):2.

**Schlenter WW**. [The expiratory second capacity of the nose--a new method to check the intranasal provocation test]. *Arch Otorhinolaryngol*. 1982;236(3):295-8. German.

**Schmid-Grendelmeier P**, Holzmann D, Himly M, Weichel M, Tresch S, Rückert B, Menz G, Ferreira F, Blaser K, Wüthrich B, Cramer R. Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1328-36.

**Schroeder JT**, Lichtenstein LM. Basophils. En: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ, eds. Asthma. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher; 1997. p. 367-80.

**Schroeder JT**. Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. Adv Immunol. 2009;101:123-61. doi: 10.1016/S0065-2776(08)01004-3.

**Sears MR**, Burrows B, Herbison GP, Flannery EM, Holdaway MD. Atopy in childhood. III. Relationship with pulmonary function and airway responsiveness. Clin Exp Allergy. 1993 Nov;23(11):957-63.

**Seitz CS**, Bröcker EB, Trautmann A. Diagnostic testing in suspected fluoroquinolone hypersensitivity. Clin Exp Allergy. 2009 Nov;39(11):1738-45. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03338.x. Epub 2009 Sep 3.

**Sergejeva S**, Malmhall C, Lotvall J, Pullertis T. Increased number of CD34+ cells in nasal mucosa of allergic rhinitis patients: inhibition by a local corticosteroid. Clin Exp Allergy 2005; 35: 34-8.

**Settipane RA**. Rhinitis. A dose of epidemiological reality. Allergy Asthma Proc 2003; 24: 147-54.

**Shatkin JS**, Delsupehe KG, Thisted RA, Corey JP. Mucosal allergy in the absence of systemic allergy in nasal polyposis and rhinitis: a meta-analysis. Otolaryngol Head Neck Surg. 1994 Nov;111(5):553-6.

**Sheahan P**, Ahn CN, Harvey RJ, Wise SK, Mulligan RM, Lathers DM, Schlosser RJ. Local IgE production in nonatopic nasal polyposis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Feb;39(1):45-51.

**Sheikh A**, Hurwitz B. House dust mite avoidance measures for perennial allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(4):CD001563.

**Sibbald B**, Strachan D. Epidemiology of rhinitis. Busse W, Holgate S, editors. *Asthma and rhinitis*. London UK: Blackwell Scientific, 1995.

**Siraganian RP**. Mechanism of IgE-mediated hypersensitivity. In *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, eds. E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Elliot, N. F. Adkinson & J. W. Yunginger 1988, 105-134. Mosby: St. Louis.

**Small P**, Black M, Frenkiel S. Effects of treatment with beclomethasone dipropionate in subpopulations of perennial rhinitis patients. *J Allergy Clin Immunol*. 1982 Sep;70(3):178-82.

**Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica**. Eds. *Alergológica: Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las Enfermedades Alérgicas en España*. Madrid 2005.

**Sogut A**, Yilmaz O, Kirmaz C, Ozbilgin K, Onur E, Celik O et al. Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 157(4):349-53.

**Spieksma FT**. Domestic mites from an acarologic perspective. *Allergy* 1997;52:360-8.

**Sporik R**, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to housedust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990;323:502-7.

**Stevenson DD**, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct;118(4):773-86.

**Stewart GA**, Thompson PJ. The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 1996;26:1020-44.

**Stewart GA**, Robinson C. The immunobiology of allergenic peptidases. *Clin Exp Allergy* 2003;33(1):3-6.

**Strachan DP**. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.

**Strachan DP**. Is allergic disease programmed in early life? *Clin Exp Allergy* 1994; 24:603-5.

**Strachan D**, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:161-76.

**Sutton BJ, Gould HJ**. The human IgE network. *Nature* 1993, Dec2; 366 (6454), 421-8.

**Svanes C**, Jarvis D, Chinn S, Burney P. Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:415-20.

## **I**

**Tada T**, Ishizaka K. Distribution of gamma E-forming cells in lymphoid tissues of the human and monkey. *J Immunol* 1970;104(2):377-87.



**Takhar P**, Smurthwaite L, Coker HA, Fear DJ, Banfield GK, Carr VA, Durham SR, Gould HJ. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):5024-32.

**Takhar P**, Corrigan CJ, Smurthwaite L, O'Connor BJ, Durham SR, Lee TH, Gould HJ. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:213-8.

**Terreehorst I**, Hak E, Oosting AJ, Tempels-Pavlica Z, de Monchy JG, Bruijnzeel-Koomen CA, Aalberse RC, Gerth van Wijk R. Evaluation of impermeable covers for bedding in patients with allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):237-46.

**Togias A**. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Mar;8(1):106-14.

**Torres MJ**, Padial A, Mayorga C, Fernández T, Sanchez-Sabate E, Cornejo-García JA, Antúnez C, Blanca M. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *Clin Exp Allergy*. 2004 Nov;34(11):1768-75.

**Torres MJ**, Canto G. Hypersensitivity reactions to corticosteroids. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;10(4):273-9. doi: 10.1097/ACI.0b013e32833b1f34.

**Torres MJ**, Blanca M. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *Med Clin North Am*. 2010 Jul;94(4):805-20, xii. doi: 10.1016/j.mcna.2010.04.006.

**Tschoop JM**, Sistek O, Schindler C, Leurenberger P, Perruchoud AP, Wultrich B et al. Current allergic asthma and rhinitis: diagnostic efficiency of three commonly used atopic markers IgE, skin prick tests and Phadiatop. Results from 8329 randomized adults from SAPALDIA Study. Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in adults. *Allergy* 1998; 53: 608-13.

## U

**Ulrich CS**, von Linstow ML, Backer V. Prevalence and predictors of rhinitis in Danish children and adolescents. *Allergy* 2000; 55: 1019-24.

**Unsel M**, Ardeniz O, Mete N, Ersoy R, Sin AZ, Gulbahar O, Kokuludag A. Food allergy due to olive. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(6):497-9.

## V

**Valero A**, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM *et al*. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug;120(2):359-65.

**Van-Cauwenberge P**, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica G, Durham S et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. EAACI position paper. *Allergy* 2000; 55: 116-34.

**van Ree R**, Aalbers M, Kea O, Marco De La Calle FM, Sempere Ortells JM, Villalba M, et al. A sensitive monoclonal antibody sandwich ELISA for the measurement of the major olive pollen allergen Ole e 1. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000; 122(3):224-8.

**van Rijswijk JB**, Blom HM, KleinJan A, Mulder PGH, Rijntjes E, Fokkens WJ. Inflammatory cells seems not to be involved in idiopathic rhinitis. *Rhinology* 2003;41:25-30.

**van Rijswijk JB**, Blom HM, Fokkens WJ. Idiopathic rhinitis, the ongoing quest. *Allergy* 2005;60:1471-1481.

**Varga EM**, Jacobson MR, Till SJ, Masuyama K, O'Brien F, Rak S, et al. Cellular infiltration and cytokine mRNA expression in perennial allergic rhinitis. *Allergy* 1999;54:338-345.

**Villalba M**, Batanero E, López-Otín C, Sánchez LM, Monsalve RI, González de la Peña MA et al. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem*. 1993;216(3):863-9.

**Villalba M**, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem*. 1994; 269(21):15217-22.

**Villalba M**, Rodríguez R, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*. 2014;66(1):44-54.

**von-Mutius E**, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:358-364.

## **W**

**Wachs M**, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Naclerio RM. Observations on the pathogenesis of nasal priming. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:492-501.

**Wang D**, Clement P, Smitz J, de Waele M, Derde MP. Monitoring nasal allergic inflammation by measuring the concentration of eosinophil cationic protein and eosinophils in nasal secretions. *Allergy*. 1995 Feb;50(2):147-51.

**Wang D**, Smitz J, Waterschoot S, Clement P. An approach to the understanding of the nasal early-phase reaction induced by nasal allergen challenge. *Allergy* 1997, 52: 162-7.

**Warner JA**, Marchant JL, Warner JO. Allergen avoidance in the homes of atopic asthmatic children: the effect of Allersearch DMS. *Clin Exp Allergy*. 1993 Apr;23(4):279-86.

**Wedbäck A**, Enbom H, Eriksson NE, Movérare R, Malcus I. Seasonal non-allergic rhinitis (SNAR)--a new disease entity? A clinical and immunological comparison between SNAR, seasonal allergic rhinitis and persistent non-allergic rhinitis. *Rhinology*. 2005 Jun;43(2):86-92.

**Weiland SK**, Stolpe S, Keil U. [Smoking among children and adolescents: a challenge for primary prevention]. *Soz Praventivmed*. 1994;39(5):293-8. German.

**Widal F**, Abrami P, Lermoyez J: Anaphylaxie et idiosyncrasie. *La presse médicale*, Paris, 1922,30:189-192.

**Wihl JA**, Malm L. Rhinomanometry and nasal peak expiratory and inspiratory flow rate. *Ann Allergy*. 1988 Jul;61(1):50-5.

**Wilson DR**, Torres LI, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003 (2):CD002893.

**Wise SK**, Ahn CN, Schlosser RJ. Localized immunoglobulin E expression in allergic rhinitis and nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Jun;17(3):216-22.

**Wright AL**, Holberg JC, Martínez FD, Halonen M, Morgan W, Taussing LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics* 1994; 94: 895-901.

**Wultrich B**, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA Study). *Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults*. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 149-56.

## Y

**Yano H**, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem*. 1993 Dec 5;268(34):25846-56.

**Ying S**, Durham SR, Barkans J, Masuyama K, Jacobson M, Rak S, Löwhagen O, Moqbel R, Kay AB, Hamid QA. T cells are the principal source of interleukin-5 mRNA in allergen-induced rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993 Oct;9(4):356-60.

**Ying S**, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, Kay AB, Durham SR. Local expression of epsilon germ line gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and non-atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;107:686-92.

